POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

SVILUPPO DI UN SISTEMA PER IL MONITORAGGIO E IL CONTROLLO DELLA STIMOLAZIONE IN PRESSIONE IN APPLICAZIONI DI INGEGNERIA DEI TESSUTI

Relatore

Prof. Ing. Monica Soncini

Correlatore

Ing. Filippo Consolo

Tesi di Laurea di

Francesco DAL DOSSO

Anno Accademico 2011-2012

Indice

Sommario I
Abstract I
1. Introduzione 10
1.1 Medicina rigenerativa 10
1.1.1 Ingegneria dei tessuti 10
1.2 Il bioreattore 15
1.3 Il sistema di controllo 16
1.4 Bioreattori nell'ingegneria dei tessuti 18
1.4.1 Bioreattore spinner flask 19
1.4.2 Bioreattore a pareti rotanti 20
1.4.3 Bioreattore a compressione 20
1.4.4 Strain bioreactor 21
1.4.5 Bioreattore a perfusione 22
1.4.6 Bioreattore a perfusione pulsatile per vasi 23
1.4.7 Bioreattore a perfusione per la proliferazione di cellule endoteliali su costrutti tubolari 24
1.4.8 Bioreattore per la stimolazione meccanica 25
1.4.9 Bioreattore per la caratterizzazione meccanica di tessuti 26
1.4.10 Set up per la decellularizzazione di tessuti 26
2. Sviluppo della componente HW e SW del sistema di controllo 29
2.1 Obiettivo del progetto 29
2.2 Hardware 30
2.2.1 La pompa volumetrica 31
2.2.1.1 Controllo remoto: interfaccia pompa – PC 32
2.2.2 Il sensore di pressione 35
2.2.2.1 Alimentazione del sensore di pressione via SW 37
2.2.3 L'elettrovalvola pinza-tubo 37
2.3 Il software del sistema di controllo 41

2.3.1 Progettazione del software di controllo 42
2.4 Ambiente di sviluppo software: LabVIEW 42
2.5 Interfaccia Utente 44
2.5.1 Il pannello Settings 46
2.5.2 Il pannello Acquisition 47
2.5.3 Il pannello Control Pump 49
2.5.3.1 Area di stimolazione 50
2.5.3.1.1 Controllo in volume: modalità manuale 50
2.5.3.1.2 Controllo in volume: modalità automatica 51
2.5.3.1.3 Stimolazione in limitazione di pressione: modalità automatica 52
2.5.3.2 Area monitoraggio stimolazione 54
2.5.3.3 Area accessoria 55
2.5.4 Il pannello Post Processing 57
2.5.5 Il pannello Advanced Settings 59
3. Architettura e collaudo del software di controllo 61
3.1 Architettura del software 61
3.1.1 Main VI 62
3.1.1.1 Ciclo Main 64
3.1.1.2 Ciclo dei Property Node 64
3.1.1.3 Ciclo del grafico pattern di stimolazione 65
3.1.1.4 Ciclo del grafico pressione-volume 65
3.1.1.5 Ciclo di Post Processing 66
3.1.2 SubVI 66
3.1.2.1 SubVI per il controllo della portata della pompa 67
3.2 Architettura delle modalità di controllo della stimolazione 68
3.2.1 Controllo in volume: modalità manuale 68
3.2.2 Controllo in volume: modalità automatica 69
3.2.2.1 Test di collaudo del volume erogato nella modalità automatica di controllo in volume 72
3.2.2.2 Modifica dell’architettura della modalità automatica in controllo di volume . 75

3.2.3 Stimolazione in limitazione di pressione: modalità automatica 78
3.3 Temporizzazione del ciclo di controllo 81
3.4 Calibrazione del segnale di tensione della pompa in valori di portata 82
3.4.1 Calibrazione per il controllo della portata espressa in RPM% 82
3.4.2 Calibrazione della portata espressa in ml/min 85
3.4.3 Verifica della procedura di calibrazione della portata espressa in RPM% e ml/min 86
4. Monitoraggio e controllo di parametri di stimolazione di organi e tessuti biologici 88
4.1 Applicazione del sistema di controllo in esperimenti con campioni biologici 88
4.2 Prove di misura di compliance di campioni di vena safena umana 89
4.2.1 Protocollo di prova 90
4.2.2 Risultati Sperimentali 94
4.3 Prove di premeabilità di un patch di tessuto urovescicale decellularizzato 96
4.3.1 Protocollo di prova 97
4.3.2 Risultati sperimentali 101
4.4 Prove di cistometria su vescica 104
4.4.1 Protocollo di prova 107
4.4.2 Risultati sperimentali 109
4.5 Prove di decellularizzazione della vescica 112
4.5.1 Set up per la decellularizzazione della vescica 113
4.5.2 Protocollo di prova 115
4.5.3 Risultati sperimentali 117
5. Conclusioni e sviluppi futuri 124
APPENDICE A 130
Bibliografia 134

Sommario

Introduzione

L'ingegneria dei tessuti (TE) è un campo di ricerca multidisciplinare che, attraverso i principi della biochimica, della medicina, dell'ingegneria, della fisica e della matematica, si propone di riprodurre *in vitro* porzioni di tessuti biologici destinati alla sostituzione di tessuti umani danneggiati a causa di eventi traumatici o affetti da patologie [1]. Oggigiorno la TE è basata sull'interazione tra componenti biologiche (cellule, medium) e biomateriali (scaffold) il tutto riposto in una camera di coltura chiamata bioreattore che fornisce alle cellule seminate sullo scaffold gli opportuni stimoli al fine di permettere la maturazione di un tessuto funzionalizzato in vitro. Il bioreattore può essere suddiviso in due sottosistemi (Figura 1): l'ambiente di coltura e il sistema di controllo. Il primo è composto da una camera di coltura, dove viene alloggiato lo scaffold seminato con cellule. Il sistema di controllo è costituito dagli attuatori, dai sensori e da un software che invia e riceve segnali dagli stessi. Il sistema permette quindi di monitorare ed agire su una o più delle variabili ambientali (pH, temperatura, ossigenazione, attività metabolica delle cellule) che caratterizzano i processi biologici in atto all'interno della camera di coltura e, nel caso di bioreattori che applicano una stimolazione del costrutto, anche sulle variabili fisiche quali sollecitazione meccanica, stimolazione elettrica e magnetica [1].

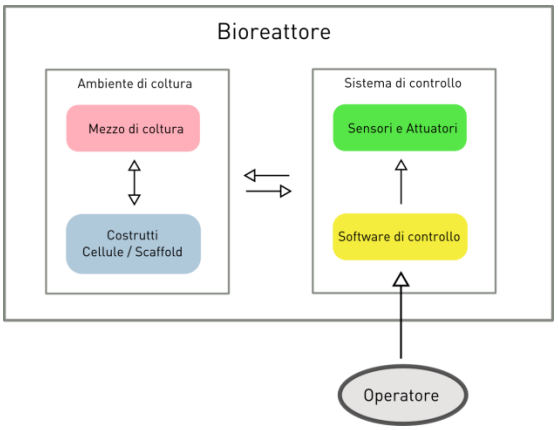


Figura 1 Schema a blocchi di un bioreattore.

In particolare si rende indispensabile la realizzazione del sistema di controllo di un bioreattore per monitorare i parametri di coltura di interesse e controllare gli stimoli che vengono applicati al costrutto [2]. Inoltre il sistema di controllo permette di raggiungere alti livelli di automazione e di standardizzazione dei processi, rendendoli così ripetibili. Questo è un requisito indispensabile se si vuole rendere l'ingegneria dei tessuti una concreta alternativa alle terapie tradizionali [3, 4].

Nel presente lavoro di tesi, svolto presso il laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale (µBS Lab) del Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria del Politecnico di Milano, ha come obiettivo lo sviluppo di un sistema per il monitoraggio

e il controllo di dispositivi in grado di applicare una sollecitazione meccanica a tessuti biologici molli. In particolare, la stimolazione applicata è di tipo pressorio, realizzata tramite l'immissione o l'aspirazione di un fluido in pressione che agisce sul tessuto/organo da stimolare.

Nel proseguo del sommario si procederà inizialmente a descrivere la componente HardWare (HW) e SoftWare (SW) del sistema di controllo sviluppato nel presente lavoro di tesi. Si discuteranno in sequenza le specifiche, l'interfaccia utente e l'architettura generale del SW oltre alle prove di collaudo effettuate per verificarne l'affidabilità. Inoltre saranno descritte le applicazioni pratiche volte alla caratterizzazione biomeccanica di tessuti biologici in cui il sistema di controllo è stato impiegato.

Sviluppo della componente HW e SW del sistema di controllo

Nel presente lavoro di tesi si è realizzato il sistema di controllo sia nella sua componente HW che SW.

I componenti HW utilizzati in questo progetto sono: i) una pompa volumetrica, ii) un sensore di pressione, iii) un'elettrovalvola pinza-tubo (EV) e iv) i cablaggi necessari per inviare e ricevere i segnali di tutti i componenti HW tramite PC.

Pompa volumetrica

L'attuatore impiegato nel progetto è una pompa volumetrica multicanale (Ismatec IPC-N 12) in grado di garantire portate comprese tra 0.39 µl/min e 11 ml/min. Inoltre la pompa è dotata di una porta analogica che ne permette il controllo via SW tramite scheda di acquisizione dati (DAQ USB-6211, National Instruments). I parametri di controllo della pompa su cui si può agire sono: i) l'avvio e l'arresto della pompa (*Start-Stop*), ii) il verso di rotazione dei rulli (orario/antiorario), iii) la portata che la pompa deve garantire (proporzionale alla velocità di rotazione dei rulli). Tramite quindi i canali di ingresso e uscita (I/O) digitali e analogici della scheda NI DAQ e il cablaggio realizzato si è potuto gestire questi comandi via SW. In Figura 2 è riportato lo schema di connessione pompa – scheda NI DAQ.

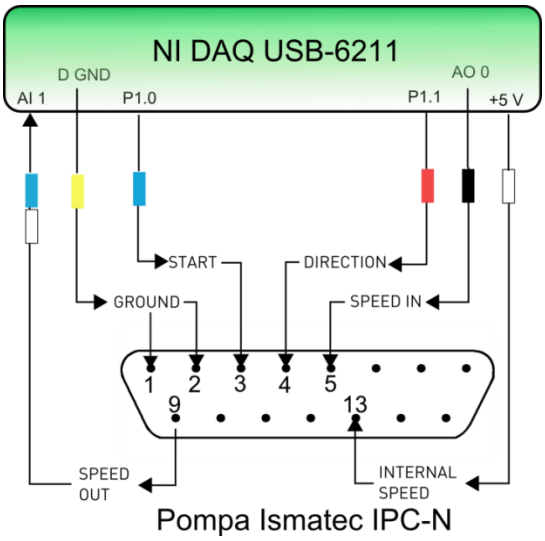


Figura 2 Schema della connessione pompa – scheda NI DAQ.

Sensore di pressione

Il sensore di pressione è stato integrato nel sistema di controllo per monitorare l'andamento della pressione che agisce sui campioni di tessuto o sugli organi stimolati in tempo reale. I sensori utilizzati in questo progetto (Honeywell 26PCA e Pendotech Press-S-000) sono stati interfacciati con il PC tramite un canale di input analogico della scheda NI DAQ per poter acquisire il segnale di pressione. Inoltre si è riusciti ad alimentare il sensore Honeywell tramite un canale di output analogico della scheda NI DAQ, riducendo così l'ingombro del set up, mentre per il sensore Pendotech è stato utilizzato un alimentatore integrato di dimensioni ridotte.

Elettrovalvola pinza-tubo

L'introduzione dell'elettrovalvola pinza-tubo (075P3MP12-02S, Bio-ChemFluidics) nel sistema di controllo è volta ad aumentare la versatilità del sistema sistema. Infatti l'EV permette di deviare il flusso di liquido tra due rami di un circuito idraulico. Ciò può essere utile in applicazioni in cui è richiesta la commutazione tra due linee diverse del circuito idraulico a seconda della fase di stimolazione del tessuto. Per controllare via SW la commutazione dell'EV, sincronizzando lo switch dell'EV con il passaggio dalla fase di infusione a quella di aspirazione della pompa, è stato realizzato un apposito circuito. Infatti l'EV richiede una potenza troppo alta per essere gestita direttamente dai canali di I/O della scheda NI DAQ. Il SW invia quindi un segnale che può assumere un valore alto (5 V) o basso (0 V) (TTL) ad un transistor BJT portandolo in uno stato rispettivamente di interdizione o saturazione. A seconda dello stato del BJT, si chiude o si apre il circuito di alimentazione del relè ad esso collegato. Il relè quindi commuta lo stato della sua bobina interna permettendo o meno il passaggio della tensione di alimentazione all'EV. Quest'ultima a seconda che riceva la sua tensione di alimentazione o meno commuta in uno stato o nell'altro.

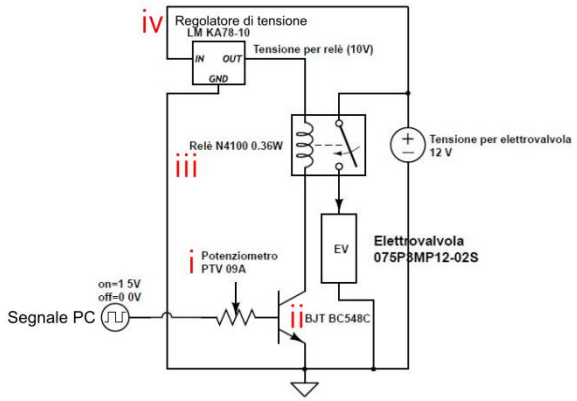


Figura 3 Schema del circuito di controllo dell'EV.

Specifiche SW di controllo

Nel presente lavoro di tesi si è sviluppato il SW di controllo in ambiente LabVIEW® 8.6. Le specifiche di progetto che il SW deve rispettare sono: i) controllare gli attuatori che applicano la stimolazione al tessuto o all'organo; ii) acquisire il segnale di pressione dal sensore di pressione; iii) controllare i parametri di output della

stimolazione (pressione, volume,...) così da agire sui parametri di input del sistema stesso al fine di mantenere i parametri di stimolazione all'interno di un range preimpostato; iv) mostrare in tempo reale l'andamento dei parametri della stimolazione; v) registrare i valori dei parametri di stimolazione così da permettere un'analisi dei dati a posteriori (post-processing); vi) avere un interfaccia utente chiara e semplice (user friendly) così da permettere l'utilizzo del SW ad utenti esperti e non; vii) avere caratteristiche di modularità così da poter integrare nuove funzionalità senza variare la struttura generale del SW; viii) caratteristiche di robustezza e affidabilità: deve garantire che le operazioni impostate vengano eseguite correttamente per tutta la durata della stimolazione.

Interfaccia utente del SW di controllo

L'interfaccia utente è divisa in 5 pannelli. Il primo dedicato all'impostazione dei primi parametri da definire in quanto non andranno più variati una volta definito il protocollo di stimolazione dell'esperimento da attuare. Il secondo è dedicato all'acquisizione del segnale di pressione e alla calibrazione del sensore di pressione. Il terzo è il pannello principale dove viene impostata e monitorata la stimolazione. Il quarto pannello è dedicato alla fase di elaborazione dati (*Post-Processing*). L'ultimo pannello è dedicato ad utenti esperti e integra parametri non inerenti direttamente alla stimolazione quanto invece ad esempio i canali di I/O utilizzati o la frequenza di acquisizione del segnale di pressione. Il pannello principale (*Pump Control*) è suddiviso in due aree principali. La prima, area di stimolazione (Figura 4), è dedicata all'impostazione dei parametri della stimolazione.

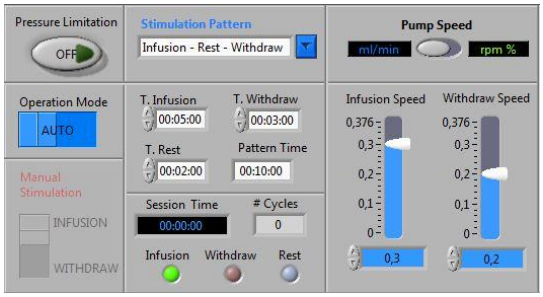


Figura 4 Area di stimolazione: controllo in volume modalità automatica.

L'utente può scegliere la modalità di controllo tra: i) controllo in volume con modalità manuale: consente di scegliere manualmente il verso di rotazione e le portate di infusione e aspirazione della pompa; ii) controllo in volume con modalità automatica che consente di scegliere il pattern di stimolazione come sequenza di tre diverse fasi (infusione, aspirazione, rest), durata e portata erogata di ciascuna fase. In questa modalità, il passaggio da una fase di infusione/aspirazione alla successiva è determinato dal confronto tra il volume erogato dalla pompa (acquisito dal SW) e il volume target impostato dall'utente. In questa modalità, la durata della fase di rest dipende dal confronto tra un contatore e la durata della fase impostata dall'utente. iii)

limitazione in pressione - modalità automatica: l'utente imposta due valori di pressione soglia, uno minimo e uno massimo, entro cui vuole mantenere la stimolazione. Il SW acquisisce il segnale di pressione dal sensore e determina il passaggio alla fase successiva del pattern di stimolazione nel momento in cui si è raggiunta una delle due soglie.

La seconda macro area del pannello di controllo è dedicata al monitoraggio della stimolazione (Figura 5).

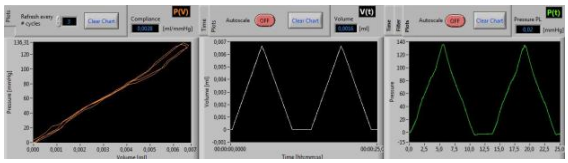


Figura 5 Area di monitoraggio della stimolazione. Da sinistra a destra: grafico P(V), grafico V(t), grafico P(t).

In quest'area l'utente, tramite tre finestre grafiche aggiornate in tempo reale, può visualizzare la pressione acquisita e il volume erogato dalla pompa rispetto al tempo di stimolazione. Inoltre è presente il grafico che mostra l'andamento della pressione in funzione del volume.

Architettura e collaudo del SW di controllo

Il SW è stato progettato e realizzato secondo una scala gerarchica che comprende due diversi livelli: nel primo livello è presente il VI principale (*Main VI*) che consente di richiamare ed eseguire i vari SubVI (sottoprogrammi) che rappresentano il secondo livello (Figura 6).

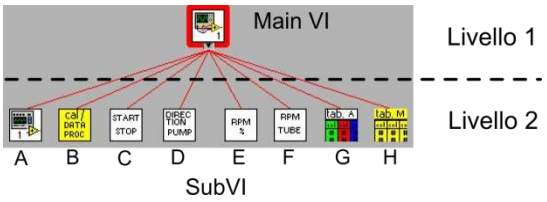


Figura 6 Struttura gerarchica del SW di controllo: il SW è suddiviso in 2 livelli, il primo livello comprende il Main VI che gestisce i vari SubVI appartenenti al secondo livello.

Il *Main Vi* è il cuore del programma. È suddiviso in 7 cicli while che gestiscono le diverse funzioni del SW. Il ciclo principale (*Main Cycle*, 1 in Figura 7) contiene il ciclo di controllo volto all'attuazione, al monitoraggio e al controllo degli attuatori (*Control Cycle*, 1A in Figura 7) e il ciclo per l'acquisizione del segnale di pressione dal sensore e di tensione dalla pompa (*Acquisition Cycle*, 1B in Figura 7).

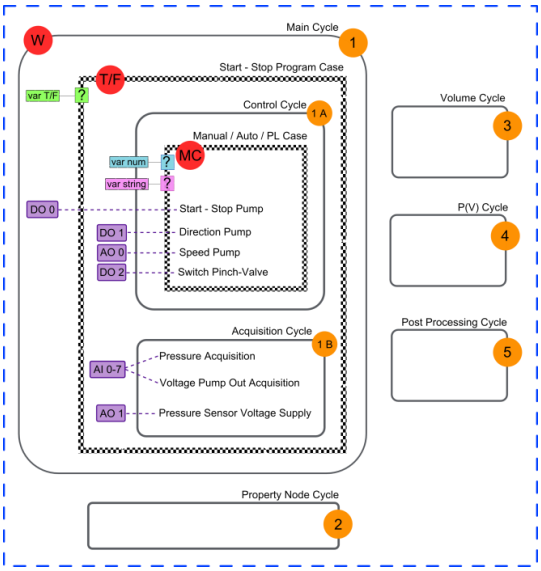


Figura 7 Schema dell'architettura dei cicli che compongono il SW di controllo: ciclo principale 1, ciclo di controllo 1A, ciclo di acquisizione 1B.

Al termine della fase di ottimizzazione del SW sono stati condotte alcune prove di collaudo delle modalità di controllo

implementate nel SW. Per la modalità controllo in volume – modalità automatica si sono verificati tre diversi pattern di stimolazione che hanno consentito di verificare il comportamento del SW valutando diversi valori di durata (minuti, secondi) e portata (µl/min, ml/min) delle fasi. In Figura 8 si riporta il tracciato per una della configurazioni utilizzate per il collaudo (basse portate, elevate durate della fasi, pattern di infusione/aspirazione/rest, IWR):

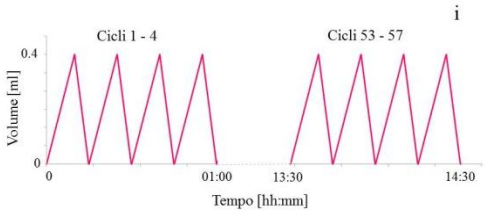


Figura 8 Tracciato del volume nel tempo per la configurazione: IWR, Q = 40 - 80 µl/min (I - W), t = 10 - 5 minuti (I-W), rest di 10 secondi.

Per la modalità limitazione in pressione-modalità automatica si è testata la capacità del SW di mantenere il pattern di stimolazione di un patch di lattice alloggiato in camera di perfusione sviluppato in un precedente lavoro di tesi, entro un range di pressioni imposto (0-40 mmHg). Il pattern di stimolazione impostato per questo collaudo prevede un ciclo IWR con portate di 5 µl/min e 50 µl/min rispettivamente per la fase di infusione e aspirazione. In Figura 9 si mostra il tracciato della pressione rispetto al tempo della prova.

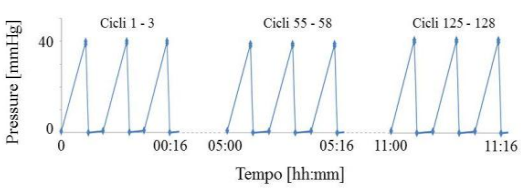


Figura 9 Tracciato delle curve di pressione rispetto al tempo in modalità automatica in limitazione di pressione ricavate dalla prova di collaudo del SW con il bioreattore a perfusione e il patch di lattice.

Le prove di collaudo eseguite hanno consentito di verificare il corretto funzionamento delle modalità di controllo del SW realizzato messe a disposizione dell'utente.

Monitoraggio e controllo di parametri di stimolazione di organi e tessuti biologici

Al termine delle prove di collaudo si è poi proceduto all'effettivo utilizzo del sistema di controllo sviluppato, impiegando il sistema per condurre 4 diverse prove sperimentali che prevedono la stimolazione con fluido in pressione di tessuti o di organi:

1) caratterizzazione delle proprietà di distensibilità (compliance) di campioni di vena safena umana;
2) misura della permeabilità di un patch di tessuto biologico decellularizzato (vescica del modello animale del coniglio) attraverso controllo del volume infuso e monitoraggio della pressione agente sul patch;
3) caratterizzazione delle proprietà di distensibilità (compliance) di un organo intero decellularizzato (vescica del

modello animale del coniglio), rispetto all'organo nativo, attraverso test di cistometria;

4) decellularizzazione dinamica di organo intero (vescica del modello animale del coniglio) attraverso infusione e aspirazione di agenti decellularizzanti.

A titolo di esempio si descrivono di seguito due dei set up realizzati, mostrando come sia stato integrato il sistema di controllo sviluppato e mettendo in risalto i vantaggi che ciò ha comportato.

Il primo set up preso in considerazione, è volto alla caratterizzazione delle proprietà di distensibilità (compliance, C) di campioni di vena safena umana. Tramite la modalità in limitazione di pressione del SW di controllo, si è potuto stimolare la vena nel suo range di pressioni fisiologico (0 - 10 mmHg), registrando il valore di pressione e di volume infuso nel tempo. Il set up realizzato in questa prova è mostrato in Figura 10.

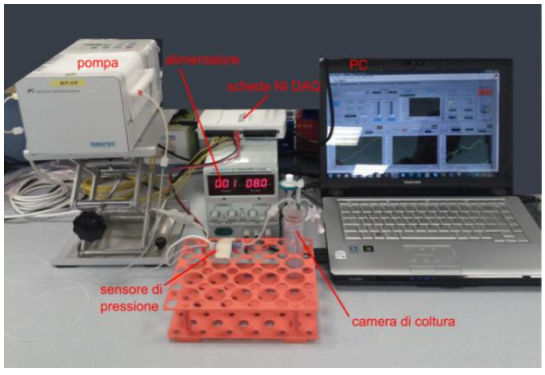


Figura 10 Set up per la misura della compliance della vena safena. Sono indicati: la pompa volumetrica, il sensore di pressione, la camera di coltura ed il PC su cui viene eseguito il SW di controllo.

Si è quindi calcolato il valore di C per due diverse portate di infusione fornite dalla pompa volumetrica: per Q=0.02 ml/min la C è pari a 0.03116 ± 0.0045 $mmHg^{-1}$ mentre per Q=0.04 ml/min è pari a 0.0301 ± 0.0006 $mmHg^{-1}$. I valori di C trovati sono confrontabili con i valori calcolati in un precedente lavoro svolto presso il µBS Lab [5] (C = 0.0522 ± 0.0122 $mmHg^{-1}$). Il set up e il sistema di controllo sviluppati, hanno permesso di migliorare le condizioni di prova del precedente lavoro, dove gli incrementi di pressione sono imposti manualmente tramite sfigomanometro e il valore del volume di liquido sequestrato dal vaso è letto su carta millimetrata. Il sistema sviluppato ha permesso quindi di rendere la prova più automatizzata e ridurre i tempi per la valutazione della compliance del vaso. Inoltre consente di misurare i valori di P e V in modo più accurato rispetto al protocollo precedente, in quanto la misura non è affetta dall'incertezza e dalla variabilità che l'intervento manuale dell'operatore può comportare.

Il secondo set up in cui è stato applicato il sistema di controllo è indirizzato alla caratterizzazione delle proprietà di distensibilità della vescica decellularizzata e alla decellularizzazione dell'organo stesso. Tramite il SW di controllo sono state eseguite prove di cistometria sull'organo pre e post decellularizzazione. In Figura 11 è

riportato un esempio di curva cistometrica di organo nativo.

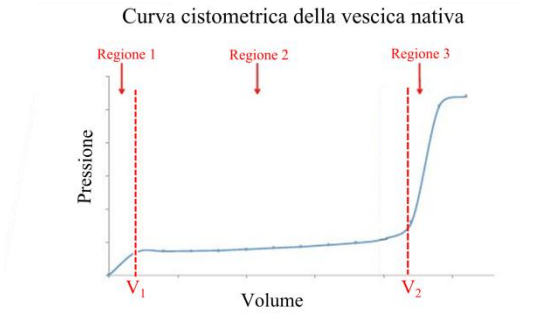


Figura 11 Curva P-V di una vescica nativa: sono evidenziate le tre regioni caratteristiche della curva in funzione di due specifici valori di volume intravescicale (V_1 e V_2).

I valori di volume V_1 e V_2 identificano tre regioni di comportamento della vescica nativa; in particolare V_2 identifica il valore di volume oltre il quale l'organo è sottoposto a una sollecitazione non fisiologica (regione di *overstretching*).

Dal confronto tra la curva cistometrica della vescica nativa e decellularizzata (Figura 12) si è potuto osservare come vi sia un comportamento diverso tra l'organo nativo e decellularizzato: nel secondo caso l'organo risponde a un incremento di volume infuso con un significativo incremento di pressione, solo dopo un valore di volume infuso ($V_{1\ post}$) molto superiore a quello necessario all'organo nativo ($V_{1\ pre}$).

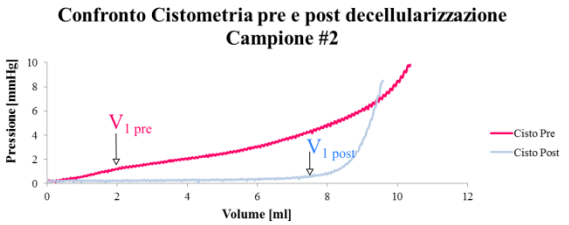


Figura 12 Confronto tra la curva P-V dell'organo nativo (Cisto Pre) e dell'organo decellularizzato (Cisto Post). Sono indicati i valori di $V_{1\ pre}$ e $V_{1\ post}$.

Le prove sono state effettuate utilizzando il SW sviluppato che ha permesso di osservare in tempo reale le curve P-V costruite acquisendo i valori di pressione dal sensore e calcolando il volume infuso in base al segnale di tensione della pompa. Nel caso della cistometria pre decellularizzazione il monitoraggio della stimolazione tramite il SW ha inoltre permesso di valutare il range di pressioni entro cui sollecitare l'organo durante il processo di decellularizzazione per mantenere la stimolazione in un range di pressioni fisiologico ($V < V_2$ in Figura 11). Ciò ha permesso di non danneggiare l'ECM dell'organo, conseguenza invece possibile nelle prove di cistometria che non consentono di visualizzare la curva P-V in tempo reale.

Il set up realizzato per la prova di cistometria è stato impiegato anche per la prova di decellularizzazione (Figura 13).

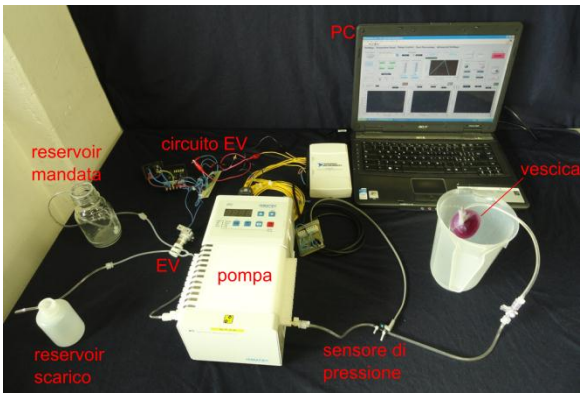


Figura 13 Set up per la prova di cistometria e decellularizzazione di vescica. Sono visibili: PC con il SW di controllo, pompa volumetrica, sensore di pressione, contenitore con la vescica, reservoir con le soluzioni decellularizzanti, reservoir di scarico, EV

Il sistema di controllo gestisce gli attuatori (pompa per infondere/aspirare, EV per

commutare tra i due rami del circuito idraulico per la decellularizzazione) e acquisisce il segnale di pressione dal sensore. Quindi, un ulteriore vantaggio di questo sistema è quello di poter integrare in un unico set up sia le prove di cistometria che quella di decellularizzazione, dove la prova di cistometria pre decellularizzazione è funzionale alla prova di decellularizzazione stessa. Ciò comporta una riduzione nei tempi delle prove.

In tutte le applicazioni, il sistema di controllo sviluppato si è dimostrato adatto ed affidabile per le prove effettuate. In due casi (misura di compliance di un vaso e protocollo di decellularizzazione della vescica) ha inoltre apportato miglioramenti sostanziali nell'esecuzione della prova e nel protocollo applicato.

Discussione

All'inizio del presente lavoro di tesi si sono fissati degli obiettivi e delle specifiche che il sistema di controllo deve rispettare. Dal punto di vista HW l'obiettivo raggiunto è stato di ottimizzare il più possibile il sistema di controllo dal punto di vista dell'ingombro e di assicurare l'affidabilità del sistema realizzato. Per quanto riguarda il SW si sono soddisfatte le specifiche descritte nella sezione *Specifiche SW di controllo*. In particolare si sono comandati gli attuatori con un buon grado di precisione e si sono integrati i segnali di volume e pressione acquisiti come variabili di controllo e limitazione della stimolazione. Quest'ultima caratteristica si è tradotta nelle due modalità di controllo automatiche: controllo in volume e limitazione di pressione. Il SW inoltre permette di monitorare in tempo reale i parametri della stimolazione e registrare i valori di pressione e volume così da poterli poi elaborare in seguito. Inoltre nelle prove per la caratterizzazione di tessuti biologici, il SW ha permesso di migliorare i set up sperimentali rispetto ad quelli preesistenti come illustrato nella sezione precedente.

1. Chaudhuri, J. and M. Al-Rubeai, *Bioreactors for Tissue Engineering: Principles, Design and Operation*. Vol. VIII, . 2005: Springer. 375.
2. Plunkett, N. and F.J. O'Brien, *Bioreactors in tissue engineering.* Technol Health Care, 2011. **19**(1): p. 55-69.
3. Martin, I., D. Wendt, and M. Heberer, *The role of bioreactors in tissue engineering.* Trends Biotechnol, 2004. **22**(2): p. 80-6.
4. Wendt, D., et al., *Potential and bottlenecks of bioreactors in 3D cell culture and tissue manufacturing.* Adv Mater, 2009. **21**(32-33): p. 3352-67.

Abstract

Introduction

Tissue engineering (TE) is a multidisciplinary research field that assimilates the principles of biochemistry, medicine, engineering, physics and mathematics. The aim of TE is to reproduce in vitro portions of biological tissues for replacement of human damaged tissues after traumas or diseases [1]. Nowadays TE is based on the interaction between biological components (cells, medium) and biomaterials (scaffold) all placed in a culture chamber called bioreactor. Bioreactors provide to the cells seeded on the scaffolds, appropriate stimuli in order to promote the maturation of a functionalized tissue in vitro. The bioreactor can be divided into two subsystems (Figure 1): the culture environment and the control system. The first is composed of a culture chamber, where is housed the scaffold seeded with cells. The control system is composed by the actuators and sensors and by a software that sends and receives signals from them. The control system therefore allows to monitor and act on one or more of the environmental variables (pH, temperature, oxygenation, metabolic activity of cells) that characterize the biological processes taking place within the culture chamber. Moreover the control system manage the physical variables such as mechanical stress, electrical stimulation and magnetic if the bioreactor applies a stimulation on the construct [1].

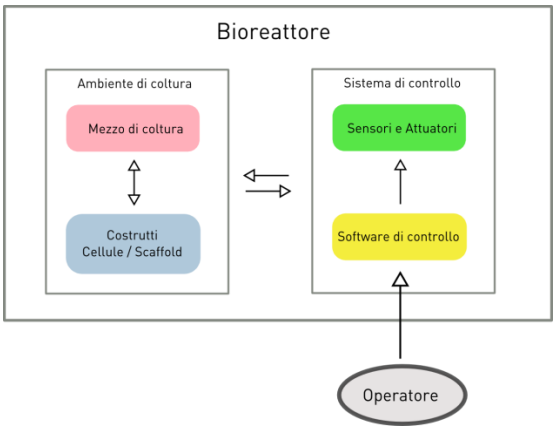


Figure 14 Bioreactor block diagram.

The realization of bioreactor's control system is necessary to monitoring the culture parameters of interest and to control the stimuli that the bioreactor applies to the construct [1]. In addition, the control system can achieve high levels of automation and standardization of processes, making them repeatable. This is a prerequisite if you want to make tissue engineering a real alternative to traditional therapies [2, 3].

The objective of the present thesis work, carried out at the µBS Lab of DEIB of the Polytechnic of Milan, is the development of a system for the monitoring and the control of devices that applies a mechanical stress

on biological soft tissues. In particular, the control system applies a pressure stimuli through the infusion or withdrawal of a pressurized fluid that acts on the tissue/organ.

In the following of the summary we will proceed initially to describe the hardware and software of the control system developed in this thesis. Will be discussed the user interface, the general architecture of the SW and the tests carried out to verify the SW. Furthermore will be described the practical applications of the control system in biological field (biomechanical characterization of biological tissues).

Development of control system's HW and SW

In the present work both HW and SW of the control system are developed.

The HW components used in this project are: i) a volumetric pump, ii) a pressure sensor, iii) a solenoid pinch valve (EV) and iv) the wiring needed to send and receive the signals of all components HW via PC.

Pump

The actuator used in the project is a multichannel volumetric pump (Ismatec IPC-N 12) able to provide flow rates between 0.39 µl/min and 11 µl/min. Furthermore, the pump is equipped with an analog port that allows the control via SW through a data acquisition board (DAQ USB-6211, National Instruments). The control parameters of the pump on which we can act are: i) the starting and stopping of the pump (Start-Stop), ii) the direction of rotation of the rollers (CW / CCW), iii) the flow rate that the pump must ensure (proportional to the speed of rotation of the rollers). Then through the channels of input and output (I / O) digital and analog of the card NI DAQ and the cabling made, it is possible to manage these commands via SW. Figure 2 shows the diagram of pump connection - NI DAQ card.

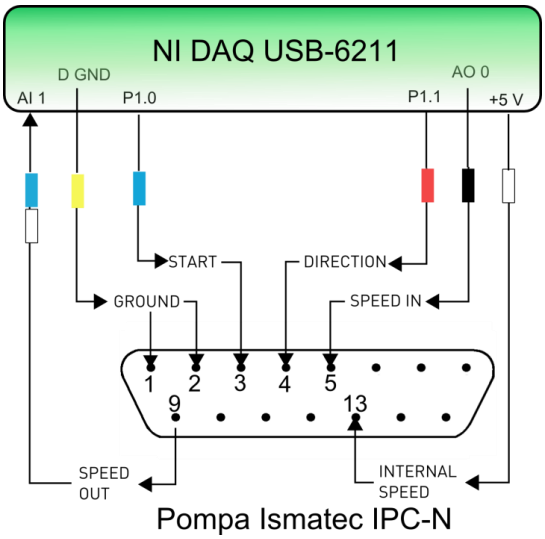


Figure 15 Diagram of pump connection - NI DAQ card.

Pressure sensor

The pressure sensor has been integrated into the control system to monitor in real time the pressure acting on the samples of tissue or organs stimulated. The sensors used in this project (Honeywell 26PCA and

Pendotech Press-S-000) were interfaced with a PC via an analog input channel of the DAQ board to acquire the pressure signal. Furthermore the Honeywell sensor is supplied via analog output channel of the DAQ card, thus reducing the overall dimensions of the set-up, while for the sensor Pendotech was used an embedded power supply of small size.

Pinch valve

The solenoid pinch valve (075P3MP12-02S, Bio-ChemFluidics) is necessary to increase the versatility of the system. In fact the EV allows to sitch the flow of liquid between two branches of a hydraulic circuit. This can be useful in applications where it is required to switch between two different lines of the hydraulic circuit according to the phase of stimulation of the tissue. To control via SW the switching of the EV it has been realized a custom circuit. In fact, the EV requires a power too high to be managed directly by the channels of I / O of the NI DAQ card. The SW sends a signal that can assume a high value (5 V) or low (0 V) (TTL) to a BJT transistor bringing it respectively in a state of interdiction or saturation. Depending on the state of the BJT, closes or opens the supply circuit of the relay connected to it. The relay then switches the state of its internal coil or not allowing the passage of the EV supply voltage. EV depending on which receives its supply voltage or less switches in one state or another.

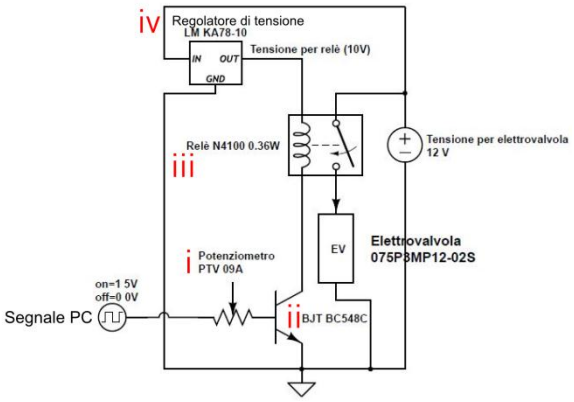


Figure 16 Diagram of the control circuit of the EV.

Control SW specific

The control SW is been developed in LabVIEW® 8.6. The design specifications that the SW must respect are: i) controlling the actuators that apply stimulation to tissue or organ; ii) acquire the pressure signal from the pressure sensor; iii) control the output parameters of the stimulation (pressure , volume, ...) in order to maintain the parameters of stimulation within a preset range; iv) show in real time the parameters of stimulation; v) record the values of the parameters of stimulation in order to allow data's post-processing; vi) have user-friendly interface also for non-expert users; vii) have characteristics of modularity to make it simple integrate new features without changing the general structure of the SW; viii) characteristics of robustness and reliability: must ensure that the operations are carried out correctly for the duration of stimulation.

User interface of the control SW

The user interface is divided into five tabs. The first is devoted to the setting of the first parameters to be defined and these parameters won't be changed once defined the stimulation protocol of the experiment to be carried out. The second is dedicated to the acquisition of the pressure signal and the calibration of the pressure sensor. The third the main panel where the stimulation is set and monitored. The fourth panel is dedicated to Post-Processing. The last panel is dedicated to expert users only and integrates parameters not related directly to the stimulation but rather for example channels of I / O used or the acquisition frequency of the pressure signal. The main panel (Pump Control) is divided into two main areas. The first, stimulation area (Figure 4), is dedicated to setting the parameters of stimulation.

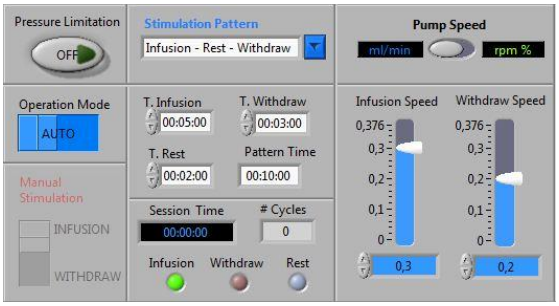


Figure 17 Area of stimulation control volume automatic mode.

The user can choose the control mode between: i) volume control with manual mode: Allows you to manually select the direction of rotation and infusion/withdraw flow rate ii) automatic volume mode that allows you to choose the stimulation pattern as a sequence of three stages (infusion, aspiration, rest), duration and flow rate of each phase. In this mode, the transition from one phase of infusion / withdraw to the next is determined by comparing the volume delivered by the pump (acquired from SW) and the volume target set by the user. In this mode, the duration of the phase of rest depends on the comparison between a counter and the duration of the phase set by the user. iii) automatic pressure limitation: the user sets two values of pressure threshold, a minimum and a maximum, in which he wants to keep the stimulation. The SW acquires the pressure signal from the sensor and determines the transition to the next phase of the stimulation pattern when it is reached one of the two thresholds.

The second macro area of the control panel is dedicated to the monitoring of the stimulation (Figure 5).

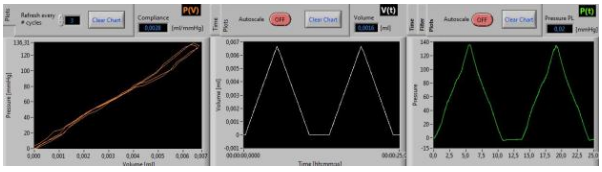


Figure 18 Monitoring area of stimulation. From left to right: graph P (V), graph V (t), graph P (t).

In this area the user, through three windows graphic updated in real time, can display the acquired pressure and the volume delivered by the pump In addition there is the graph that shows the trend of the pressure versus volume.

Architecture and testing of the control SW

The software has been designed and built according to a hierarchy that includes two levels: the first level is the main VI (Main VI) that allows you to call and execute the various SubVI (subprograms), which represent the second level (Figure 6).

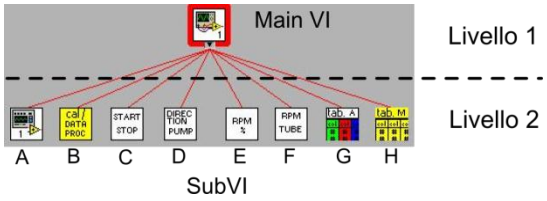


Figura 19 Hierarchical structure of the SW control: the SW is divided into two levels, the first level includes the Main VI that handles the various SubVI belonging to the second level.

The Main VI is the heart of the program. It is divided into seven while cycles managing the various functions of the software. The main loop (Main Cycle, 1 in Figure 7) contains the control cycle that monitoring and control the actuators (Control Cycle, 1A in Figure 7) and the cycle for the acquisition of the pressure signal from the sensor and voltage from the pump (Acquisition Cycle, 1B in Figure 7).

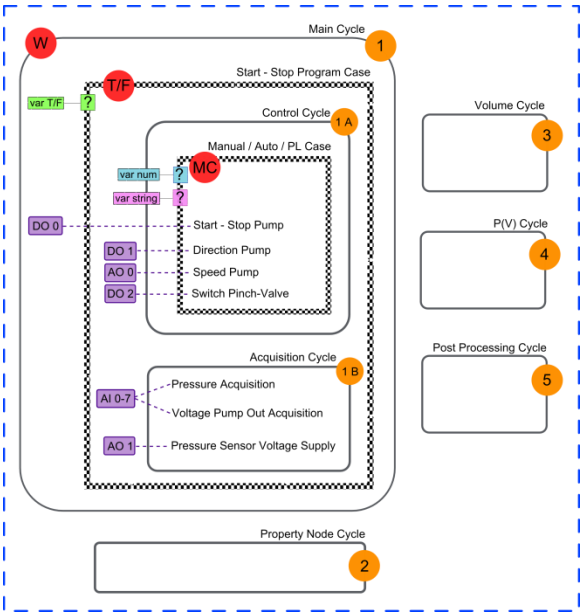


Figure 20 Diagram of the cycles that make up the control SW: 1 main loop, control loop 1A, 1B acquisition cycle.

At the end of the optimization of the SW some arrangements are implemented in the SW. Automatic control volume is tested with three different stimulation patterns that allowed us to verify the behavior of the SW considering different values of time (minutes, seconds) and flow (µl/min, ml/min) phases . Figure 7 shows the layout for the configurations used for testing (low flow, high durations of the phases, patterns of infusion/aspiration/rest, IWR):

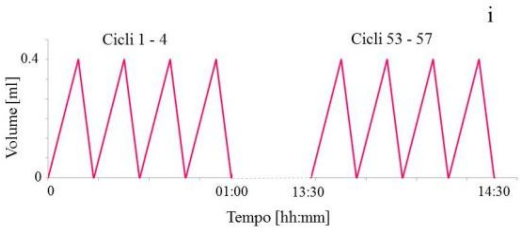


Figura 21 Track volume over time for configuration: IWR, Q = 40 to 80 l / min (I - W), t = 10 - 5 minutes (IW), rest 10 seconds.

For the pressure limitation mode was tested the ability of SW to maintain the pattern of stimulation within a range of pressures

imposed (0-40 mmHg) on a patch of latex housed in a perfusion chamber developed in a previous thesis work. The stimulation pattern set for this testing involves a cycle IWR with flow rates of 5 µl/min and 50 µl/min respectively for the phase of infusion and withdraw. Figure 9 shows the layout of the P(t).

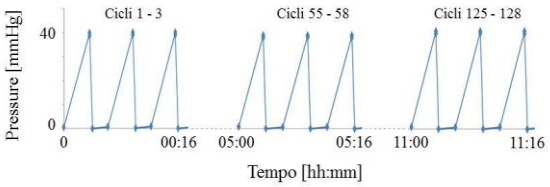


Figure 22 Routes of curves of pressure versus time in automatic mode in pressure limitation derived from the acceptance test of the SW with the perfusion bioreactor and the patch of latex.

The tests carried out have made it possible to check the proper functioning of the control arrangements of the SW made available to the user.

Monitoring and control of parameters of stimulation of organs and biological tissues

At the end of the tests, it is proceeded to the actual use of the control system developed, using the system to conduct 4 different experimental for the stimulation with pressurized fluid of tissues or organs:

1) characterization of the properties of distensibility (compliance) of samples of human saphenous vein;

2) measurement of the permeability of a patch of biological tissue decellularized (rabbit bladder) via volume control infusion and pressure monitoring agent on the patch;

3) characterization of the properties of distensibility (compliance) of an entire organ decellularized (rabbit bladder), compared with native organ, through testing cystometry;

4) dynamics decellularization of entire organ (rabbit bladder) through infusion and withdraw of decellularizing agents.

As example, we describe below two sets made up, showing how control system was integrated in the set up highlighting the benefits.

The first set-up made into consideration, is aimed at the characterization of the properties of distensibility (compliance, C) of samples of human saphenous vein. Through the pressure limitation mode of the SW control, we could stimulate the vein in his physiological pressures range (0 - 10 mmHg), recording the value of pressure and volume infused over time. The set-up achieved in this test is shown in Figure 10.

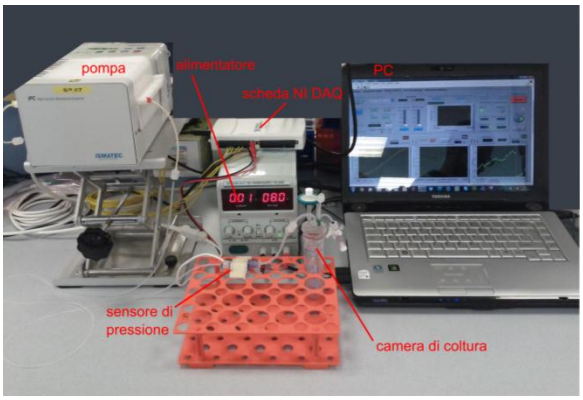


Figure 23 Set-up for measuring the compliance of the saphenous vein. Are shown: the pump, the pressure sensor, the culture chamber and the PC that is running the SW control.

It was therefore calculated the value of C for two different flow rates of infusion provided by the pump: for Q = 0.02 ml / min, the C is equal to 0.03116 ± 0.0045 $mmHg^{-1}$ while for Q = 0.04 ml / min is equal to 0.0301 ± 0.0006 $mmHg^{-1}$. C values found are comparable with the values calculated in a previous work carried out at the μBS Lab [1] (C = 0.0522 ± 0.0122 $mmHg^{-1}$). The set-up and control system developed, have improved the test conditions of the previous work, where the pressure increases are imposed manually by a manometer and the value of the volume of fluid is seized by the graph paper. The system developed has therefore made it possible to make the test more automated and reduce the time for the evaluation of the compliance of the vessel. It also allows you to measure the values of P and V more accurately than the previous protocol, because the measure is not affected by uncertainty and variability that manual intervention of the operator can result.

The second set-up in which was applied the control system is directed to the characterization of the properties of distensibility of the bladder and to the decellularization of the organ itself. Through the SW control tests were carried out on the organ of cystometry pre and post decellularization. In Figure 11 is an example of a curve cystometric of native organ.

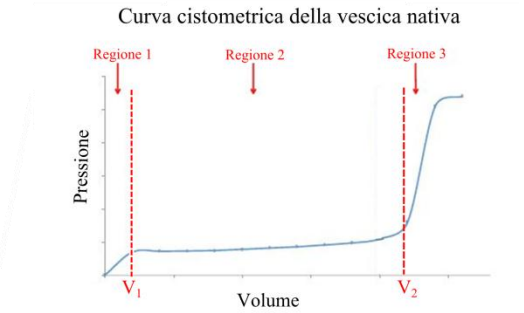


Figura 24 PV curve of a native bladder: the three regions are highlighted curve characteristics as a function of two specific values of intravesical volume (V1 and V2).

The values of volume V1 and V2 identify three regions of behavior of native bladder; in particular V2 identifies the volume value beyond which the organ is subjected to a non-physiological stress (region of overstretching).

From the comparison between the cystometric curve of native and decellularized bladder (Figure 12) it has been observed that there is a different behavior between the native and decellularized organ: in the second case the body responds to an increase of volume infused with a significant increase pressure, only after a value of the volume infused (V1 post) much higher than that needed organ native (pre V1).

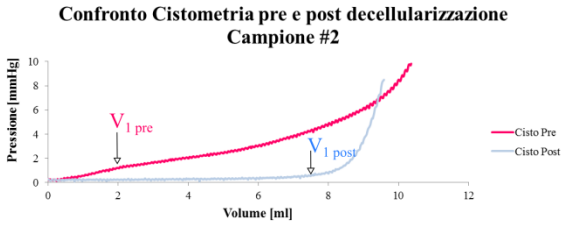


Figure 25 Comparison of the PV curve organ native (Cistus Pre) and decellularized organ (Cistus Post). Are the values of V1 and V1 pre post.

The tests were carried out using the SW developed which allowed to observe in real

time the PV curves constructed by acquiring the pressure values from the sensor and calculating the volume infused according to the voltage signal of the pump. In the case of cystometry pre decellularization monitoring of stimulation through the SW has also enabled us to assess the range of pressures within which urge the organ during the process of decellularization to maintain pacing in a range of physiological pressures (V <V2 in Figure 11). This has allowed not to damage the ECM organ, can result in the tests instead of cystometry that do not display the PV curve in real time.

The set-up made for the test of cystometry was also employed for the test of decellularization (Figure 12).

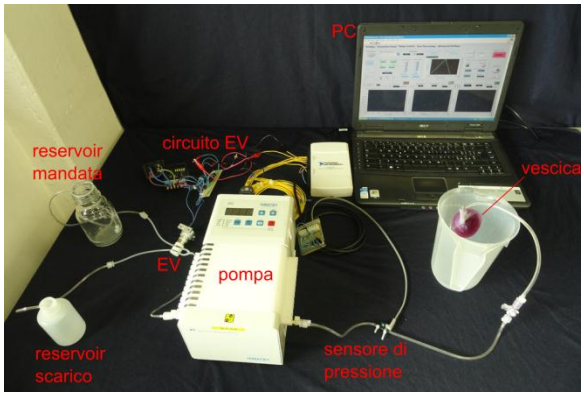


Figura 26 Set up for the test and Cystometry decellularization of the bladder. Are visible: PC with the SW control, volumetric pump, pressure sensor, the container with the bladder, with the solutions decellularizzanti reservoir, reservoir exhaust, EV.

The control system operates the actuators (pump to infuse / aspirate, EV to switch between the two branches of the hydraulic circuit for the decellularization) and acquires the pressure signal from the sensor. Therefore, a further advantage of this system is to be able to integrate into a single set-up both the cystometry test and decellularization test, where the test of cystometry pre decellularization is functional to the test of decellularization same. This entails a reduction in the times of the tests.

In all applications, the control system developed has proved suitable and reliable for tests. In two cases (measure of compliance of a vessel and protocol decellularization of the bladder) also made substantial improvements in the performance of the test and the protocol applied.

Discussion

In this thesis all the objective and specifications are reached. From the point of view of the objective HW achieved was possible to optimize the more the control system from the point of view footprint as well as ensuring the reliability of the system realized. As regards the SW have met the specifications described in the Specifications section control SW. In particular, the actuators are controlled with a good degree of accuracy and is able to integrate the signals of volume and pressure acquired as control variables and limitation of stimulation. This last feature has resulted in the two modes of automatic control: control volume and pressure limitation. The

software also allows to monitor in real time the parameters of the stimulation and record the values of pressure and volume so that they can then post processed. Also in the tests for the characterization of biological tissues, the SW has improved the experimental set-up compared to existing ones as shown in the previous section.

1. Chaudhuri, J. and M. Al-Rubeai, *Bioreactors for Tissue Engineering: Principles, Design and Operation*. Vol. VIII, . 2005: Springer. 375.

2. Plunkett, N. and F.J. O'Brien, *Bioreactors in tissue engineering.* Technol Health Care, 2011. **19**(1): p. 55-69.

3. Martin, I., D. Wendt, and M. Heberer, *The role of bioreactors in tissue engineering.* Trends Biotechnol, 2004. **22**(2): p. 80-6.

4. Wendt, D., et al., *Potential and bottlenecks of bioreactors in 3D cell culture and tissue manufacturing.* Adv Mater, 2009. **21**(32-33): p. 3352-67.

1.

Introduzione

1.1 Medicina rigenerativa

La medicina rigenerativa è una branca della medicina che si prefigge di essere una concreta alternativa alle tecniche di medicina tradizionale quali trattamenti chirurgici a carattere estirpativo del tessuto/organo patologico, trattamenti farmacologici, trapianto di organi. Quest'ultimo, nonostante sia l'unico trattamento in grado di ristabilire totalmente le funzioni dell'organo danneggiato, presenta svariate problematiche come il rigetto e la scarsa disponibilità di organi umani a fronte di una richiesta sempre crescente. La medicina rigenerativa, rispetto alla tecniche tradizionali, si basa su un approccio diverso ossia riparare e/o ricostruire tessuti patologici [6]. Uno dei principali vantaggi di questa tecnica è il poter impiegare cellule autologhe (prelevate dal paziente stesso), siano esse staminali o differenziate, superando così il problema del rigetto e della terapia immunosoppressiva derivante dall'utilizzo di componente cellulare non autologa nel corpo del paziente.

La medicina rigenerativa comprende più tecniche, anche molto diverse tra loro come la terapia cellulare, la terapia genica e l'ingegneria dei tessuti [7].

Il presente lavoro di tesi s'inserisce nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, quindi andremo ad analizzare più nel dettaglio questo ramo.

1.1.1 Ingegneria dei tessuti

L'ingegneria dei tessuti (TE) è un campo di ricerca multidisciplinare che, attraverso i principi della biochimica, della medicina, dell'ingegneria, della fisica e della matematica, si propone di costruire *in vitro* porzioni di tessuti biologici destinati alla sostituzione di tessuti umani danneggiati a causa di eventi traumatici o affetti da patologie [1]. Riportiamo di seguito una delle prime definizioni di cosa sia l'ingegneria dei tessuti data dal Dr. Robert Langer nel 1993.

"an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function or a whole organ" [8]

"un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita con l'obiettivo di sviluppare strutture biologiche che possano riparare, mantenere o migliorare le funzioni di un tessuto o di un organo intero" [8]

Oggigiorno la TE è basata sull'interazione tra componenti biologiche (cellule, medium) e biomateriali (scaffold) il tutto posto in una camera di coltura chiamata bioreattore che fornisce alle cellule seminate sullo scaffold gli opportuni stimoli chimici (pH, pO_2, fattori di crescita) e/o fisici (meccanici, elettrici, magnetici) al fine di permettere la maturazione di un tessuto funzionalizzato in vitro (Figura 1.1).
Gli enormi progressi scientifici fatti in questi ultimi anni nel campo dei biomateriali (nuovi materiali, superfici biomimetiche e tecniche di lavorazione innovative), nell'utilizzo delle cellule staminali e nello sviluppo di nuovi bioreattori hanno creato i presupposti per l'affermazione e l'effettivo impiego clinico di procedure legate all'ingegneria dei tessuti.
Già nella seconda metà degli anni ottanta sono stati pubblicati i primi lavori in cui sono stati presentati tecniche e approcci che successivamente sono confluiti sotto il nome di ingegneria dei tessuti, ma solo nel corso di questi ultimi venticinque anni le pubblicazioni scientifiche si sono fatte sempre più numerose e specializzate.

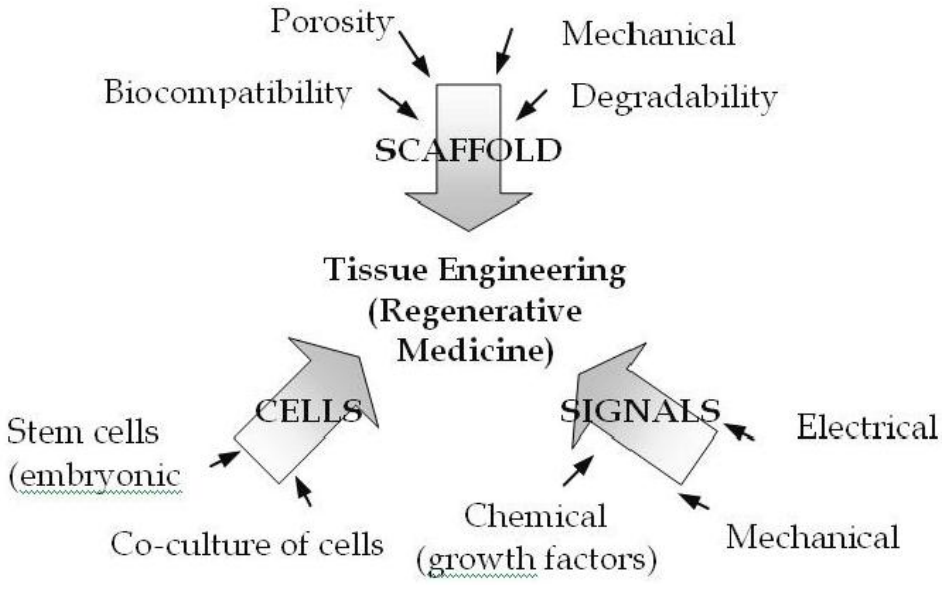


Figura 1.1 L'interazione tra componente biologica, biomateriali e stimoli indotti dal bioreattore costituiscono la base dell'ingegneria dei tessuti.

Brevemente vengono descritti i tre elementi principali dell'ingegneria dei tessuti.
Le cellule impiegate possono essere di diversa provenienza:

- Autologhe: prelevate dallo stesso individuo su cui sarà eseguito l'impianto. Questo tipo di cellule abbatte drasticamente i problemi di rigetto e di trasmissione di malattie
- Allogeniche: provenienti da un donatore della stessa specie
- Xenogeniche: ottenute da un donatore di un'altra specie (origine animale)

Inoltre si può fare una distinzione in funzione dello stato di differenziamento delle cellule:

- Primarie: cellule differenziate che hanno quindi una funzione ben definita (cellule muscolari, nervose, epiteliali…)
- Staminali: cellule indifferenziate che hanno la capacità, maturando sotto opportune condizioni fisico-chimiche, di differenziare in cellule specializzate di vario tipo

Possono essere impiegate cellule di tessuti fluidi come il sangue, o di tessuti solidi come la pelle. Nel primo caso vengono usati metodi come la centrifugazione o l'aferesi per separare le cellule di interesse dalle altre componenti. Per quanto riguarda invece le cellule di tessuti solidi si procede a una biopsia per prelevare una porzione del tessuto di interesse e successivamente alla frammentazione del tessuto. Tramite l'impiego di enzimi, che digeriscono la matrice extracellulare (ECM), si ottengono sospensioni cellulari che saranno poi trattate come nel primo caso.
La componente biologica sia essa tessuto, organo o anche semplicemente un aggregato di cellule va mantenuta in un ambiente che riproduca le condizioni in cui le cellule si trovano all'interno dell'organismo, ossia in vivo. Per questo motivo l'elemento biologico è sempre immerso o sospeso in un medium per colture cellulari che ne garantisce il corretto apporto di nutrienti e di fattori di crescita oltre a mantenere condizioni osmotiche e di pH ideali. In commercio sono disponibili varie tipologie di medium, tra cui il Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), uno dei più diffusi.
Il secondo elemento principale è lo scaffold, un supporto generalmente tridimensionale in cui sono seminate le cellule e che funge da elemento di sostegno meccanico-strutturale durante la fase di maturazione in vitro. Inoltre la struttura e la composizione chimica dello scaffold favoriscono l'adesione e la migrazione cellulare. Infatti, gli scaffold cercano di mimare l'architettura della matrice extracellulare del tessuto che si vuole ricreare per fornire alle cellule un ambiente in cui crescere, maturare e proliferare il più simile possibile a quello biologico. Uno scaffold per il tessuto osseo quindi avrà caratteristiche molto diverse da uno per la rigenerazione del tessuto muscolare. Gli scaffold possono essere biodegradabili o permanenti, naturali o

sintetici, ma devono sempre essere biocompatibili, ossia non generare una reazione dannosa o comunque indesiderata dal punto di vista dell'interazione con i tessuti biologici dell'organismo con cui vengono a contatto. Materiali sintetici ampiamente usati sono ad esempio l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) e il policaprolattone (PCL). Per quanto riguarda gli scaffold biologici stanno avendo sempre più successo, per i vantaggi che comportano, le matrici decellularizzate di tessuti e organi, siano essi animali o umani. Poiché questo tipo di scaffold non è altro che l'organo che si vuole ricreare privato solo della componente cellulare è comprensibile come la sua architettura e le sue proprietà meccaniche siano molto simili a quelle volute. Diversi studi [9, 10] hanno dimostrato come il processo di decellularizzazione di un organo o tessuto mantenga sufficientemente l'organizzazione strutturale della ECM e, una volta che la matrice è stata ricellularizzata, permetta di ripristinare le opportune proprietà meccaniche del tessuto ingegnerizzato, ossia paragonabili a quelle del tessuto nativo.

Il processo di decellularizzazione è necessario per eliminare la componente cellulare. Questa ultima, infatti, sia nel caso di tessuti umani non autologhi che di tessuti animali, provocherebbe nel paziente in cui viene impiantato l'organo o il tessuto il fenomeno del rigetto, obbligando il paziente ad un trattamento farmacologico a vita. Inoltre aumentano le possibilità di trasmettere malattie da donatore a ricevente [1]. Sono stati valutati vari protocolli di decellularizzazione ma in generale tutti si basano su tre fasi [9, 10]:

i. la prima prevede un'azione litica sulle cellule, che comporta quindi la rottura delle membrane cellulari;
ii. la seconda fase è volta alla rimozione delle componenti cellulari e nucleiche in modo da eliminare quei residui che potrebbero indurre risposte infiammatorie o immunitarie. Con questo procedimento si aumenta inevitabilmente il grado di permeabilità della matrice poiché le cellule distaccate lasciano dei vuoti tra le strutture della ECM;
iii. l'ultima fase di lavaggio permette di ripulire la matrice ottenuta sia dai residui nucleici non rimossi nella fase precedente, sia dagli eventuali residui (chimici o enzimatici) degli agenti decellularizzanti utilizzati.

Possono essere utilizzate tre tipologie di agenti decellularizzanti: agenti chimici (detergenti ionici e non e solventi), biologici (enzimi e agenti chelanti) e fisici (temperatura, pressione e elettroporazione) [9]. Il protocollo di decellularizzazione va poi adattato al tessuto o organo che si vuole decellularizzare variando ad esempio il tempo di esposizione del tessuto/organo all'azione degli agenti decellularizzanti, in funzione della densità cellulare, dello spessore e dell'organizzazione del tessuto considerato.

Il terzo macro componente impiegato nell'ingegneria dei tessuti è il bioreattore. Il bioreattore può essere suddiviso in due sottosezioni: l'ambiente di coltura e il sistema di controllo. Il primo è composto da una camera di coltura, dove viene alloggiato lo scaffold seminato di cellule. Questa camera deve garantire un ambiente sterile così che il costrutto non possa andare incontro a contaminazione batterica, che porterebbe alla morte cellulare. Il sistema di controllo è costituito dagli attuatori, dai sensori e da un software che comanda e riceve segnali dagli stessi. Il sistema permette quindi di monitorare ed agire su una o più delle variabili ambientali (pH, temperatura, ossigenazione, attività metabolica delle cellule) dei processi biologici in atto all'interno della camera di coltura e, nel caso di bioreattori che prevedono una stimolazione del costrutto, anche sulle variabili fisiche quali sollecitazione meccanica, stimolazione elettrica e magnetica [3] (Figura 1.2).

I bioreattori sono un'introduzione relativamente recente nel campo dell'ingegneria dei tessuti. Sono stati mutuati dall'industria delle biotecnologie dove sono impiegati per la proliferazione di cellule eucariote e procariote al fine di produrre in larga scala antibiotici, enzimi o geni ricombinanti da impiegare poi in altri processi industriali [1]. Sono anche utilizzati per applicazioni ancor più distanti dalla medicina rigenerativa come il trattamento delle acque reflue per la loro purificazione o processi alimentari di varia natura come la fermentazione controllata [2, 3].

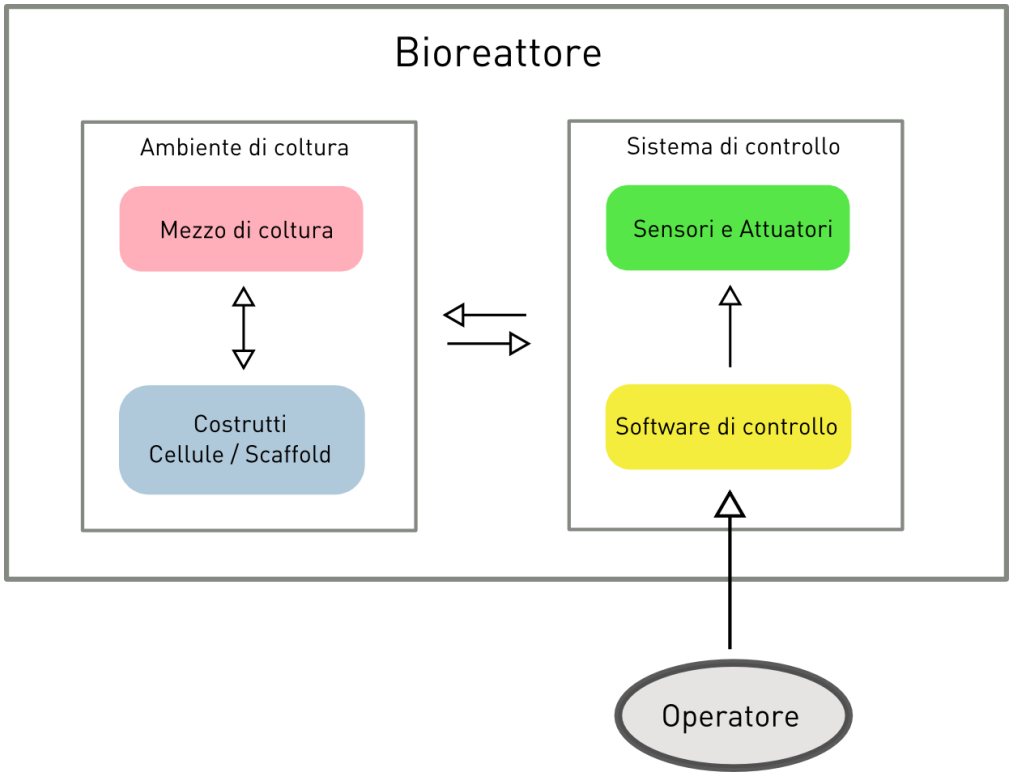


Figura 1.2 Schema a blocchi di un bioreattore.

1.2 Il bioreattore

Poiché il presente lavoro di tesi è incentrato sulla realizzazione di un sistema di controllo per bioreattori, andiamo ora ad analizzare più nel dettaglio la caratteristiche, le specifiche e la applicazioni di questo elemento. L'introduzione dei bioreattori nell'ingegneria dei tessuti ha permesso di migliorare i risultati che si erano fino a quel momento ottenuti ed ha quindi dato un significativo contributo a questo campo di ricerca. Prima della loro introduzione, infatti, la comunità scientifica si era focalizzata principalmente sulla realizzazione di tessuti monostrato *in vitro*, come ad esempio il tessuto epiteliale o il tessuto cartilagineo, utilizzando una piastra Petri come camera di coltura [4]. Non appena si è cercato di ricreare tessuti di maggior spessore o formati da più linee cellulari, ci si è scontrati con difficoltà come il non adeguato trasporto di massa ovvero di apporto di ossigeno e di nutrienti e rimozione di cataboliti. Inoltre attuando una cultura priva di stimoli esterni siano essi meccanici o elettrici, si è potuto osservare come le cellule in alcuni casi andassero incontro a de-differenziamento cellulare, passando quindi dalla linea cellulare di interesse ad una indesiderata. [2]. È nata dunque la necessità di impiegare sistemi di coltura più complessi in grado di ricreare il più fedelmente possibile le condizioni presenti *in vivo.*

Il campo di applicazione dei bioreattori inizialmente era limitato ad attività nell'ambito della ricerca scientifica di laboratorio. In questa fase quindi le specifiche che il bioreattore deve necessariamente rispettare, riguardano le modalità di semina cellulare sullo scaffold, il condizionamento fisico e l'ottimizzazione del trasporto di massa, tralasciando altre specifiche. In questa fase, infatti, non è necessario soddisfare specifiche come ad esempio la riduzione dell'ingombro del bioreattore o il rispetto di specifici criteri costruttivi per la sua industrializzazione [2]. Questa fase dello sviluppo è quindi maggiormente incentrata a ricreare le condizioni ottimali per la coltura e lo sviluppo del tessuto. In questo stadio molte operazioni sono ancora soggette all'intervento dell'operatore e questo limita il grado di riproducibilità delle prove eseguite [11].

Volendo quindi trasferire il processo di produzione di tessuti ingegnerizzati ad un livello diverso, quello dell'industrializzazione, è chiaro come altre specifiche debbano essere introdotte. Non è più solo sufficiente ricreare le condizioni presenti *in vivo* e sollecitare il costrutto con opportuni stimoli, ma è necessario anche il monitoraggio di queste condizioni e stimolazioni per permettere ad esempio un ricambio del medium automatico una volta esausto o il controllo, nel caso di applicazioni di stimoli meccanici, dei valori di deformazione imposti dal sistema di attuazione al tessuto in crescita. Il sistema di coltura deve quindi consentire di automatizzare il processo,

caratteristica propria di tutti i processi industriali. Ciò permette inoltre un alto grado di riproducibilità e standardizzazione delle prove [11]. L'automazione del processo permette di ridurre i costi di produzione rispetto a un sistema che prevede l'intervento manuale dell'operatore in molte sue fasi, fattore non trascurabile nella produzione in larga scala di qualsiasi prodotto.

Il fine ultimo dell'ingegneria dei tessuti è produrre costrutti ingegnerizzati che abbiano le proprietà e le caratteristiche adeguate per poter essere utilizzabili poi in ambito clinico. Per passare a questa fondamentale fase del processo, il bioreattore deve soddisfare ulteriori specifiche, volte a garantire la sicurezza e l'incolumità dei pazienti che riceveranno questo tipo di costrutti, come la sterilità, il rispetto di determinati standard di qualità e l'adozione di pratiche di laboratorio standardizzate. Anche il bioreattore e il suo sistema di controllo devono quindi garantire sicurezza, affidabilità ed efficacia che devono essere motivate attraverso trial clinici. Devono inoltre rispettare tutte le normative vigenti di controllo di qualità (QC) e garantire gli standard del GMP (Good Manufacturing Practice) [4, 11]. Solo rispettando queste specifiche si può quindi pensare ad una applicazione clinica dei bioreattori e dei prodotti che esso aiuta a ricreare.

Per soddisfare tutti i requisiti illustrati finora, risulta indispensabile l'impiego di un bioreattore inteso come camera di coltura per il costrutto ma soprattutto di un sistema di controllo che sia in grado di monitorare tutti i parametri della coltura e gli stimoli che vengono applicati al costrutto. Inoltre solo raggiungendo alti livelli di automazione e di standardizzazione di questi processi, rendendoli così riproducibili, si può pensare di rendere l'ingegneria dei tessuti una concreta alternativa alle terapie tradizionali. L'elemento che può favorire il raggiungimento di questi obiettivi è senza dubbio il bioreattore dotato di un sistema di controllo.

1.3 Il sistema di controllo

Il sistema di controllo si compone di due parti sinergiche: l'hardware e il software.

Con hardware s'intendono gli elementi fisici che controllano e monitorano il bioreattore. Nel caso di un bioreattore a perfusione avremmo quindi un attuatore idraulico, generalmente una pompa, che gestisce ad esempio il ricircolo del medium e impone le sollecitazioni desiderate al costrutto in termini di gradiente di pressione e perfusione. Si possono poi avere dei sensori per monitorare i parametri della coltura, come un sensore di pressione, di portata, di pH o di ossigeno. Tutte queste componenti devono essere gestite in modo preciso e sincrono e di questo si occupa il software di controllo. Un programma per la gestione di un bioreattore deve quindi controllare gli attuatori, siano essi pompe, attuatori meccanici o elettrodi per la stimolazione, e

deve poter acquisire i segnali inviati dai sensori volti al monitoraggio del processo in corso. Per rendere più completo, robusto e affidabile il processo, il sistema di controllo deve anche essere dotato di un sistema di "retroazione". Ciò fa si che il sistema di controllo possa ri-assegnare il valore corretto del segnale d'ingresso dell'attuatore, qualora esso sia diverso dal valore desiderato a causa di eventuali disturbi, sulla base del segnale di uscita effettuato dal trasduttore durante il processo (Figura 1.3).

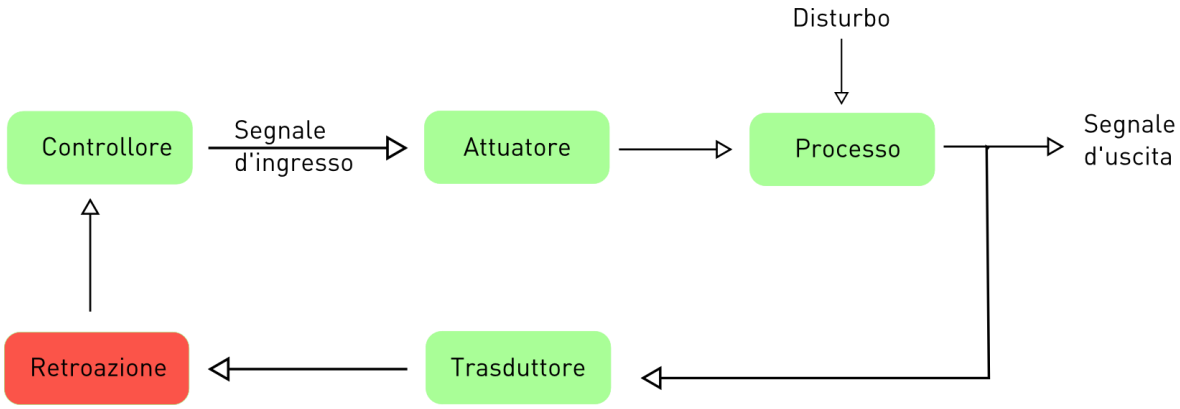


Figura 1.3 Schema a blocchi di un sistema di controllo retroazionato

Il vantaggio di introdurre una retroazione nel sistema di controllo non è solo di correggere eventuali valori indesiderati dell'uscita causati da disturbi esterni, ma anche di consentire al sistema di adattarsi alle condizioni della coltura che possono variare nel tempo. Infatti, in esperimenti di coltura di lunga durata, fino a decine di giorni, possono essere necessarie condizioni di coltura diverse, sia in termini biochimici (richiesta di un maggior apporto di nutrienti in seguito a proliferazione cellulare) sia in termini di stimolazione fisica (diversa sollecitazione da applicare a causa delle mutate proprietà meccaniche del tessuto in crescita).

I vantaggi che un sistema di controllo automatizzato comporta sono molteplici. Come illustrato anche in precedenza, la possibilità di condurre più prove a parità di condizioni di stimolazione è una specifica fondamentale per dare consistenza e validità a una campagna sperimentale [4]. Inoltre un aumento del grado di automazione del processo può garantire un minor rischio di contaminazioni, possibili durante i vari passaggi manuali necessari nel caso di sistemi non automatizzati, e, riducendo gli interventi manuali dell'operatore, assicura una minor variabilità intra ed inter-operatore, conseguenza altrimenti inevitabile in quanto non solo ogni operatore non opera allo stesso modo ma anche uno stesso operatore non può garantire la riproducibilità esatta delle manovre tra una prova e l'altra [2, 4].

Oltre a garantire un'attuazione più precisa, ripetibile e standardizzata dei parametri di controllo, un programma per il controllo del bioreattore permette un'altra funzione fondamentale: il monitoraggio dei parametri fisico-chimici della coltura. Soprattutto nella fase di ottimizzazione

del set di parametri della coltura, diventa indispensabile poter seguire l'evoluzione temporale dei parametri della coltura. Poter osservare solo il risultato finale al termine della coltura non permette di capire quale parametro possa aver causato eventuali dati inattesi e quando questo problema si sia presentato [4]. Un software che consente la visualizzazione in tempo reale dei parametri biochimici e di stimolazione invece da la possibilità all'utente di intervenire tempestivamente su tali variabili nel momento in cui ad esempio, la richiesta metabolica oppure le proprietà meccaniche (nel caso vi sia presente una sollecitazione meccanica in atto) delle cellule o del costrutto siano variate [4]. Ciò consente quindi di adattare i parametri della coltura durante la coltura stessa così da garantire sempre le migliori condizioni al costrutto biologico.
Oltre alla visualizzazione in tempo reale, deve essere data anche la possibilità di registrare i dati d'interesse così da poter eseguire un'analisi dei dati a posteriori (post-processing) in modo da poter analizzare l'andamento dei parametri della coltura nel caso in cui non si siano potuti monitorare costantemente durante l'esperimento. Inoltre tracciare l'andamento di queste variabili consente di poter capire più facilmente l'eventuale causa del fallimento di una coltura o identificare gli eventi temporali a cui si riferiscono determinati eventi [3, 4].
Il presente progetto di tesi si è concentrato sulla realizzazione di un sistema di controllo per bioreattori a perfusione. Ulteriore specifica del progetto era di rendere il sistema di controllo il più versatile possibile, ossia capace di adattarsi a differenti applicazioni (differenti camere di coltura, differenti regimi stazionari, differenti tipi di tessuti).

1.4 Bioreattori nell'ingegneria dei tessuti

Il bioreattore è uno strumento che deve adattarsi allo specifico contesto in cui viene applicato, fornendo di volta in volta funzionalità e caratteristiche diverse, pur mantenendo alcune specifiche di base. Di seguito sono elencate alcune tra le più significative specifiche. Quando si progetta un bioreattore quindi bisogna fare in modo che quest'ultimo sia in grado di [7]:

- assicurare condizioni sterili dei campioni coltivati;
- garantire che i materiali con i quali è costruito il bioreattore siano biocompatibili ed adatti all'interazione con costrutti cellularizzati;
- mantenere il campione di tessuto in coltura sotto condizioni fisiologiche;
- garantire un flusso di medium adeguato, sia in condizioni stazionarie sia per stimoli ciclici, per esempio pulsatili;
- garantire il corretto apporto di nutrienti e l'eliminazione dei metaboliti;

- monitorare i parametri biologici delle cellule e/o tessuti come le concentrazioni dei fattori di crescita e delle altre componenti (nutrienti, antibiotici, sali ecc) presenti nel medium di coltura;
- fornire al tessuto in formazione stimoli meccanici come compressione, sforzi idrodinamici, sforzi di taglio e gradienti di pressione a seconda del tessuto;
- ridurre i fenomeni di moto turbolento del fluido;
- minimizzare il volume di priming di tutto il circuito per ridurre i costi;
- facilitare l'inserimento e la semina dello scaffold all'interno della camera di coltura;
- permettere una facile pulizia e sterilizzazione dei componenti che formano il bioreattore;
- avere dimensioni limitate da permetterne l'alloggiamento all'interno di incubatori standard.

Tutti i bioreattori devono soddisfare questi requisiti generali, poi ognuno può soddisfare ulteriori requisiti in funzione delle differenti applicazioni per il quale è stato progettato. Esistono quindi varie tipologie di bioreattori per differenti applicazioni che andremo di seguito a descrivere brevemente.

1.4.1 Bioreattore spinner flask

I bioreattori *spinner flask* sono composti da pochi elementi e la loro architettura è relativamente semplice. Uno o più scaffold sono immersi in una camera riempita con medium per colture cellulari e sospesi in esso tramite degli aghi (Figura 1.4). Tramite la rotazione di una barretta magnetica, posta all'interno della camera, viene messo in movimento il medium attorno allo scaffold. Il moto convettivo del fluido che si genera, favorisce il trasporto di massa di ossigeno e metaboliti e la rimozione di cataboliti [2]. Questo tipo di bioreattori presenta molte limitazioni: le cellule che sono penetrate più in profondità nello scaffold non ricevono sufficiente apporto di nutrienti e ossigeno e quindi o vanno incontro ad apoptosi o migrano verso la superficie dello scaffold. Inoltre non è possibile applicare stimoli di tipo meccanico o elettrico se non lo sforzo di taglio sulle pareti dello scaffold generato dal moto del medium. Le applicazioni sono quindi molto limitate [2]. Questo tipo di bioreattori solitamente non è associato ad un sistema di controllo.

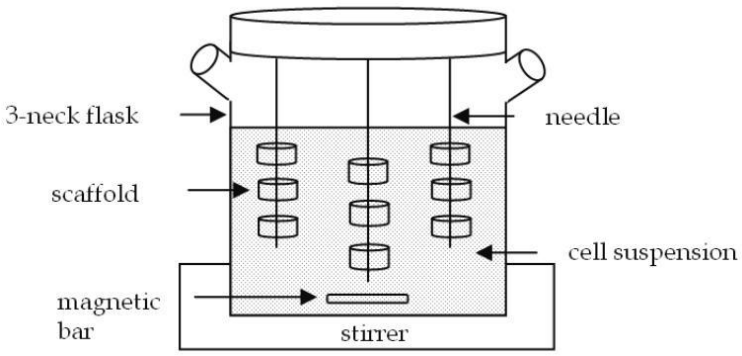


Figura 1.4 Esempio schematico di bioreattore spinner flask

1.4.2 Bioreattore a pareti rotanti

Questo tipo di bioreattori può essere visto come l'opposto dei bioreattori spinner flask. In questa tipologia di bioreattore, infatti, è il costrutto a muoversi all'interno del medium e non viceversa. Lo scaffold, alloggiato su un supporto cilindrico e immerso nel medium, è messo in rotazione tramite un attuatore posto all'esterno della camera di coltura (Figura 1.5). Questo permette una semina e quindi una colonizzazione cellulare più omogenea nello scaffold rispetto agli spinner flask anche se permane il problema del non adeguato trasporto di massa per elevate densità cellulari o spessori del costrutto [2]. Sono utilizzati per coltivare costrutti tubolari come i vasi.

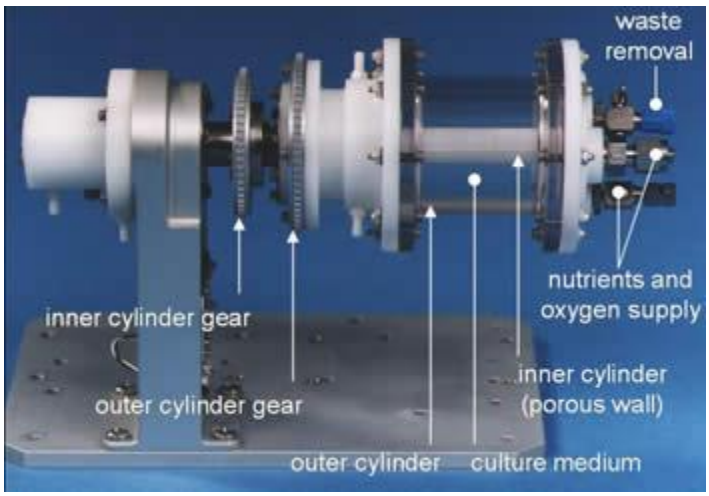


Figura 1.5 Esempio di bioreattore a pareti rotanti.

1.4.3 Bioreattore a compressione

Questa tipologia di bioreattori è ampiamente utilizzata nella rigenerazione del tessuto cartilagineo e osseo. Tramite questo sistema di coltura è possibile applicare al costrutto sia una sollecitazione statica, quindi una compressione costante nel tempo, che un carico dinamico, ossia

una sollecitazione meccanica variabile nel tempo per intensità e verso [12]. Un studio condotto da Mauck et al. [13] nel 2005 dimostra come una compressione meccanica dello scaffold seminato con condrociti favorisca la produzione di componenti della ECM oltre a mantenere il fenotipo delle cellule seminate. Il sistema di attuazione del bioreattore descritto da Mauck et al. consiste in una cella di carico messa in movimento da un motore di tipo stepper. Il sistema è gestito da un software sviluppato in ambiente LabVIEW che permette di applicare vari patterns di stimolazione agendo sulla forma d'onda, la frequenza e la durata dello stimolo applicato al costrutto (Figura 1.6). Questo sistema di controllo quindi permette di agire sui parametri di stimolazione meccanica della coltura.

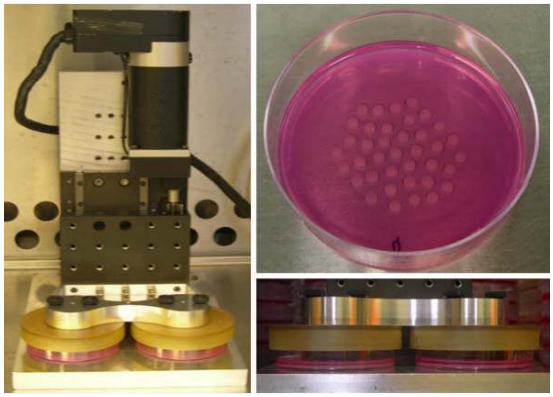


Figura 1.6 Bioreattore a compressione volto alla rigenerazione di tessuto cartilagineo.

1.4.4 Strain bioreactor

Questi bioreattori sono caratterizzati dalla capacità di applicare uno sforzo e quindi una deformazione al tessuto ingegnerizzato. Sono principalmente utilizzati per tessuti come muscoli, tendini, legamenti, ossa o cartilagine, poiché la deformazione provocata dallo sforzo applicato sullo scaffold consente di replicare la sollecitazione che il tessuto ha in vivo [2]. In uno studio condotto da Altman et al. [14] si mette in evidenza come un bioreattore che riesca a garantire uno sforzo meccanico su una matrice seminata con cellule stromali umane del midollo osseo (*human bone marrow stromal cell*, hBMSC) possa favorire le rigenerazione del legamento crociato anteriore. Il sistema è composto da una camera di coltura dove è posta la matrice, una camera adibita allo scambio dei gas per controllare l'ossigenazione del medium e il valore di pH, una pompa peristaltica multicanale per il ricircolo del medium, un sistema per il controllo della temperatura e un sottosistema per il controllo della stimolazione meccanica (Figura 1.7).

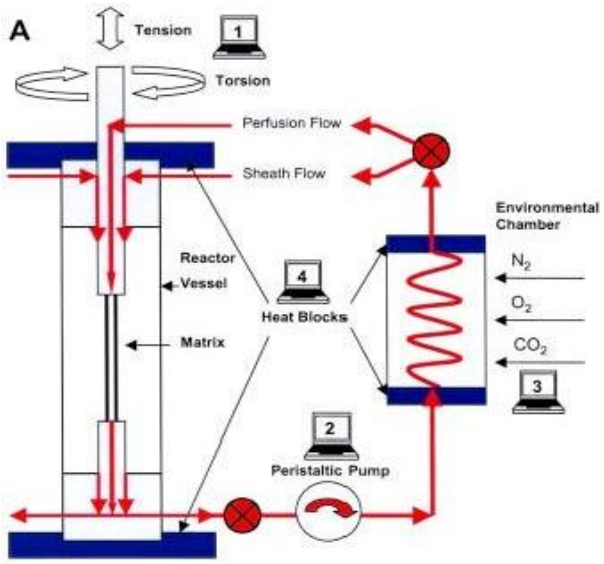


Figura 1.7 Schema del sistema di coltura, stimolazione e controllo volto alla rigenerazione del legamento crociato anteriore.

In questo lavoro il sistema di controllo è stato pensato per gestire l'attuazione del motore stepper (1 in Figura 1.7) via software tramite un programma realizzato in ambiente di programmazione Visual Basic V. 6.0. Consente all'utente di impostare il pattern di stimolazione variando i parametri dello sforzo (torsionale o monoassiale) applicato (modulo, verso, fase di rest) e della sua durata (frequenza, numero di cicli) [14].

Il controllo della pompa peristaltica (2 in Figura 1.7) permette di scegliere tra varie modalità di perfusione per la semina cellulare garantendo portate comprese in un ampio range (0.25 - 25 ml/min).

Grazie poi a quattro microcontrollori (4 in Figura 1.7) il sistema è in grado, tramite una retroazione, di leggere il valore corrente di temperatura e attivare una termocoppia per mantenere la temperatura sempre al valore desiderato (37° C).

In questo progetto viene anche gestita e monitorata l'ossigenazione e il valore di pH del medium. Un flussimetro (3 in Figura 1.7) gestisce le singole portate dei gas (azoto, ossigeno, anidride carbonica) così da ottenere la miscela con le concentrazioni appropriate all'interno della camera (*Environmental Chamber* di Figura 1.7) [14].

1.4.5 Bioreattore a perfusione

I bioreattori a perfusione sono tra i più diffusi nelle applicazioni di ingegneria dei tessuti poiché le loro caratteristiche si adattano a più tessuti, dai vasi al tessuto osseo. Questa tipologia di bioreattori è stata introdotta per superare le limitazioni presenti in altri tipi di bioreattori come quelli spinner flask, soprattutto per quanto riguarda il trasporto di massa e la semina della cellule

sullo scaffold. Il principio di funzionamento è di seguito brevemente descritto: un costrutto viene fissato in una camera di coltura e il medium gli fluisce attraverso, messo in moto da una pompa a monte della camera [2]. La perfusione può essere di due tipi: confinata o meno. Nel primo caso il medium è costretto a fluire attraverso i pori dello scaffold (Figura 1.8 A) mentre nel caso di costrutti tubolari il medium scorre all'interno ed all'esterno del vaso (Figura 1.8 B).

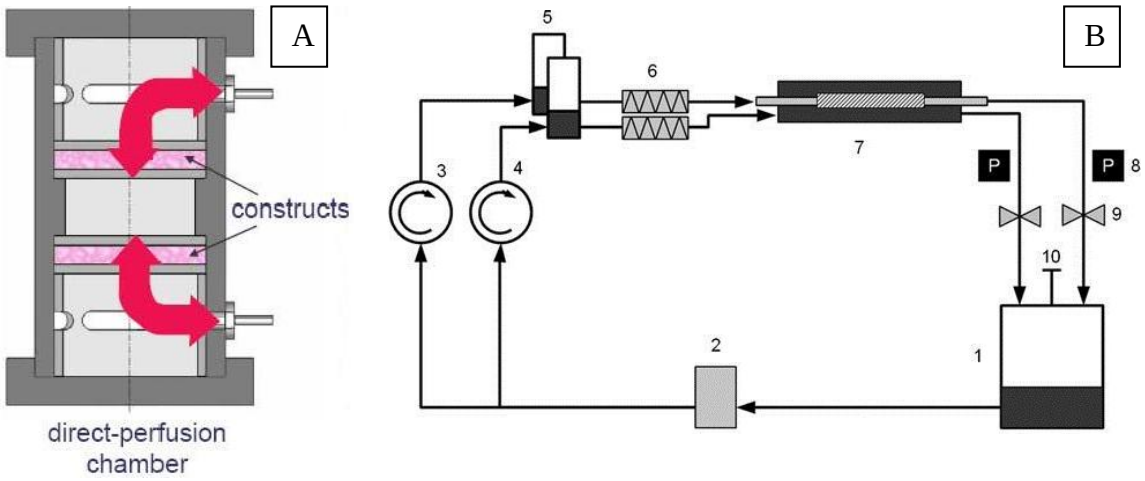


Figura 1.8 A) esempio di bioreattore a perfusione confinata; B) schema a blocchi di un bioreattore a perfusione per costrutti tubolari.

1.4.6 Bioreattore a perfusione pulsatile per vasi

Questa categoria di bioreattori è particolarmente indicata per la rigenerazione di strutture tubolari come vasi sanguigni. Il tipo di stimolazione che viene applicata al costrutto è una deformazione radiale pulsatile delle pareti del vaso, al fine di replicare le condizioni fisiologiche in cui il vaso è sottoposto al flusso pulsatile del sangue. Questa sollecitazione viene impartita tramite il flusso del medium all'interno del vaso stesso. Un esempio di bioreattori pulsatili per costrutti vascolari è presentato da S. Diamantouros nel suo progetto per la tesi di dottorato [15]. Questo lavoro è particolarmente significativo poiché presenta un sistema di controllo completo e relativamente simile a quello sviluppato in questo lavoro di tesi. Il sistema è composto da due circuiti idraulici, il primo preposto alla sollecitazione della parete interna del vaso mentre il secondo agisce su quella esterna. Il fluido, pompato da un reservoir (A), è mosso da una pompa centrifuga (B) che fornisce un flusso costante, mentre la componente pulsatile è data dall'attuazione di un motore lineare che agisce su una camera (F) posta a valle del costrutto vascolare (E) (Figura 1.9).

Il sistema sviluppato prevede anche un software di controllo e monitoraggio, sviluppato in ambiente di programmazione LabVIEW 8.6. Questo programma permette di controllare tramite PC l'attuatore che genera il segnale pulsatile, potendone variare ampiezza e frequenza. Il

software raccoglie anche gli input trasmessi dai sensori di pressione (D) (uno a valle e uno a monte della camera di coltura), dal flussimetro (G) e dal sensore di gas e pH (I) potendo così monitorare queste variabili durante la campagna sperimentale [15].

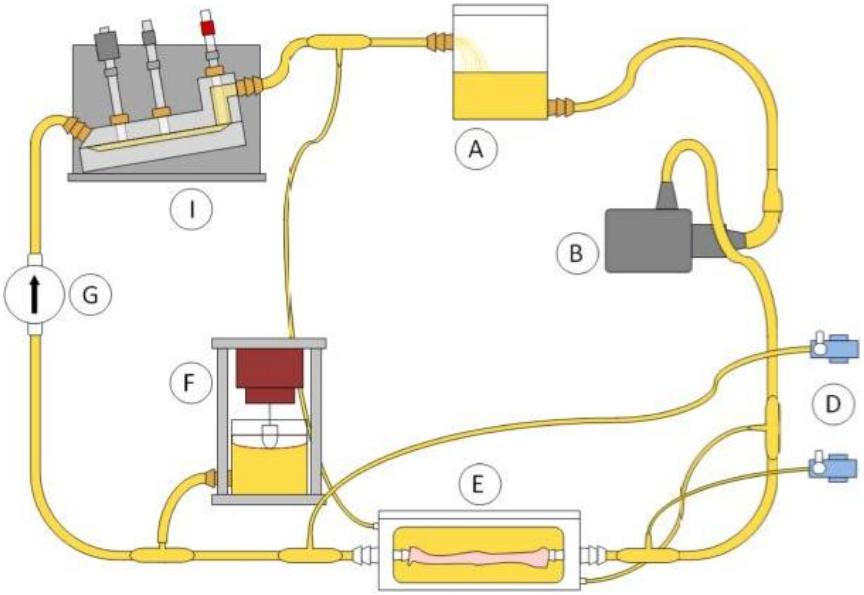


Figura 1.9 Schema del bioreattore a perfusione pulsatile per graft vascolari.

1.4.7 Bioreattore a perfusione per la proliferazione di cellule endoteliali su costrutti tubolari

Un altro esempio di bioreattore a perfusione è quello presentato da Shkilnyy at al. nel 2011 [16]. In questo lavoro il gruppo di ricerca si è concentrato maggiormente sull'ottimizzazione del sistema di coltura ed in particolare ha implementato un controllo retroazionato sulle variabili biochimiche come la concentrazione di O_2 e il pH. Grazie a un software sviluppato in ambiente LabVIEW, il sistema è in grado di leggere in real time i valori di pH e pressione parziale di ossigeno del medium e tramite una retroazione agisce sulle portate dei gas (CO_2 e O_2) che si mescolano nella camera di ossigenazione così da mantenere costanti i valori impostati di pH e pO_2. Il programma consente inoltre di monitorare e registrare altri parametri della coltura come la pressione ai capi del costrutto tubolare e la portata di medium che vi fluisce attraverso. Uno schema di tutto il sistema di coltura è riportato in Figura 1.10.

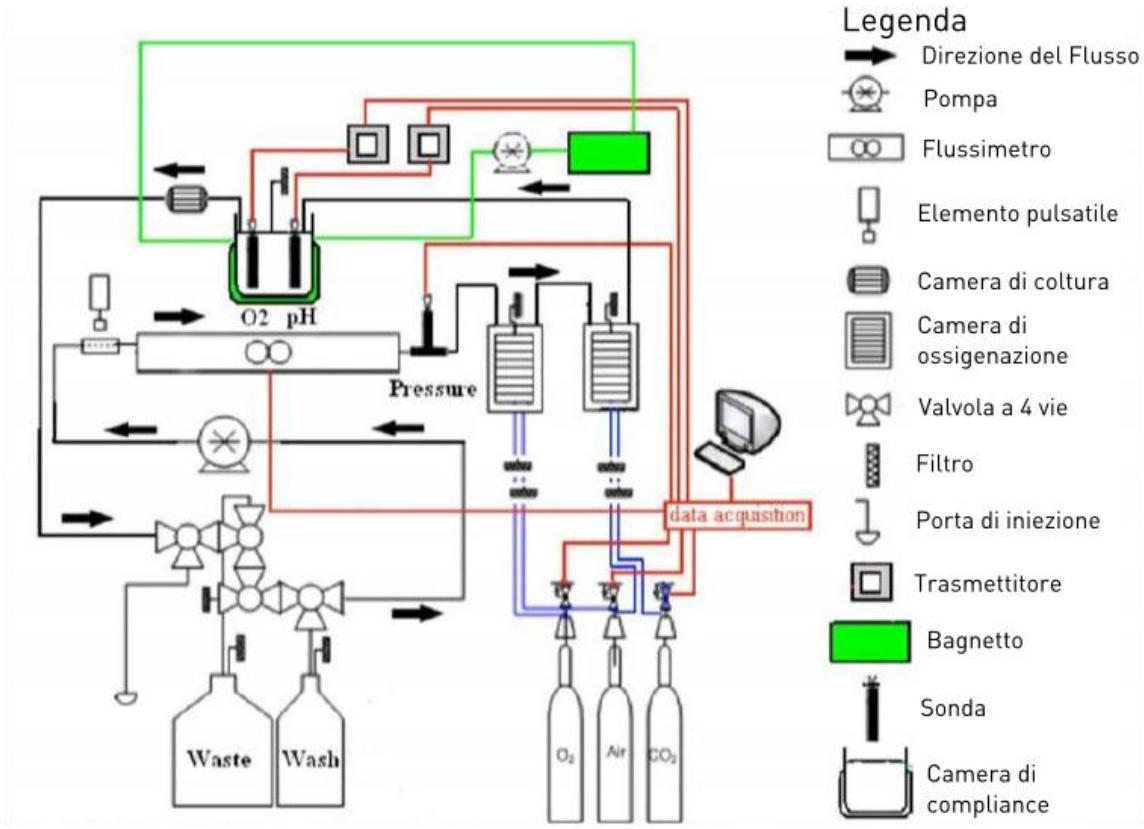


Figura 1.10 Schema a blocchi del bioreattore a perfusione per la proliferazione di cellule endoteliali.

1.4.8 Bioreattore per la stimolazione meccanica

Il lavoro condotto da Wallis et al. nel 2008 [17] presenta i vantaggi che un bioreattore capace di applicare stimoli meccanici fisiologici, abbia nella rigenerazione dei tessuti molli. Il bioreattore è composto da due camere separate dallo scaffold il quale è mantenuto in posizione da due anelli di sostegno (Figura 1.11). L'obiettivo del sistema di controllo è sollecitare lo scaffold seminato in un range di pressioni prestabilito (0 – 10 cmH_2O) con dinamiche diverse tra la fase d'incremento di pressione e quella di decremento (decine di minuti e decine di secondi rispettivamente). Ciò è possibile grazie a un software commerciale (Laborie Medical Technologies' UDS software) che permette tramite un controllo in retroazione, di compensare le variazioni esterne così da mantenere i valori di pressione che agiscono sul costrutto bidimensionale all'interno del range prestabilito. Inoltre consente all'utente di visualizzare i valori di pressione in tempo reale. Il sistema di controllo di questo bioreattore presenta alcuni aspetti che saranno sviluppati anche nel presente lavoro di tesi.

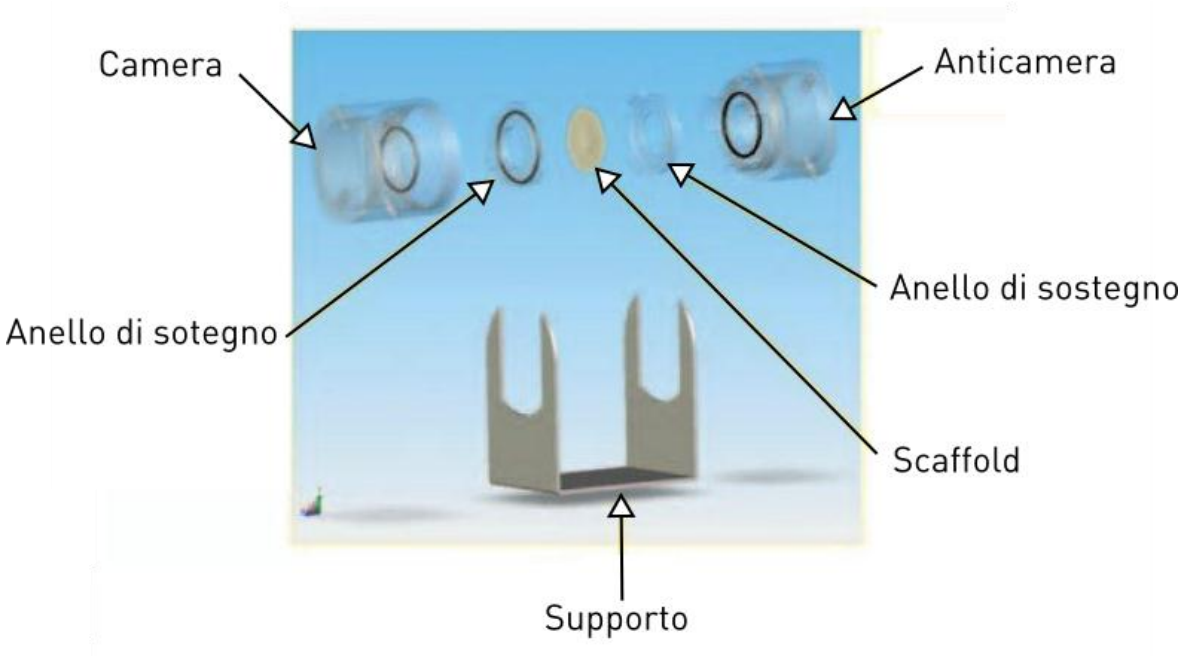


Figura 1.11 Componenti del bioreattore per la stimolazione meccanica di tessuto urovescicale.

Anche in questo caso si può osservare come un sistema di controllo associato a una camera di coltura consenta di coltivare e sollecitare il costrutto avvicinandosi il più possibile alle condizioni fisiologiche. Inoltre permette di rendere ripetibili le condizioni tra diverse prove e consente di monitorare i parametri della coltura.

1.4.9 Bioreattore per la caratterizzazione meccanica di tessuti

I bioreattori non sono solo pensati per rigenerare porzioni di tessuto o organi interni, ma hanno anche altre funzioni. Sono impiegati ad esempio per valutare le proprietà meccaniche dei costrutti alloggiati al loro interno. Nel lavoro presentato da Schipke et al. [18] si è sviluppato un bioreattore per la sollecitazione ciclica della valvola aortica. Questo sistema permette di sottoporre il campione a diversi cicli di sollecitazione, variando l'intensità e la frequenza dei cicli di pressione applicati andando ad agire su di una pompa che regola il flusso nel circuito. Grazie a un software sviluppato in ambiente LabVIEW, l'utente può quindi sottoporre la valvola a cicli di sollecitazione simulando la condizione fisiologica o svariate condizioni patologiche. Ciò permette ai ricercatori di comprendere meglio come la valvola reagisca a diversi gradienti di pressione.

1.4.10 Set up per la decellularizzazione di tessuti

Come illustrato nel paragrafo 1.1.1, le matrici decellularizzate di organi sono considerate delle ottime alternative agli scaffold tradizionali sintetici. Per ottenere questo tipo di supporti, l'organo o il tessuto da decellularizzare deve essere sottoposto a un protocollo ben preciso. Anche in

questo campo i bioreattori intesi come camere per la decellularizzazione, possono garantire quelle condizioni di sicurezza, ripetibilità, controllo e automazione che sono necessarie se si vuole ampliare il campo di applicazione delle matrici decellularizzate. Un esempio ne è il lavoro prodotto da Sullivan e il suo gruppo di ricerca nel 2012 [10]. In questo progetto è stato messo a punto un sistema capace di decellularizzare contemporaneamente più organi (rene). Due taniche (a) con diversi agenti decellularizzanti sono collegate alternativamente ad una pompa peristaltica multicanale (c) la quale garantisce la perfusione degli organi (f) e la loro conseguente decellularizzazione (Figura 1.12).

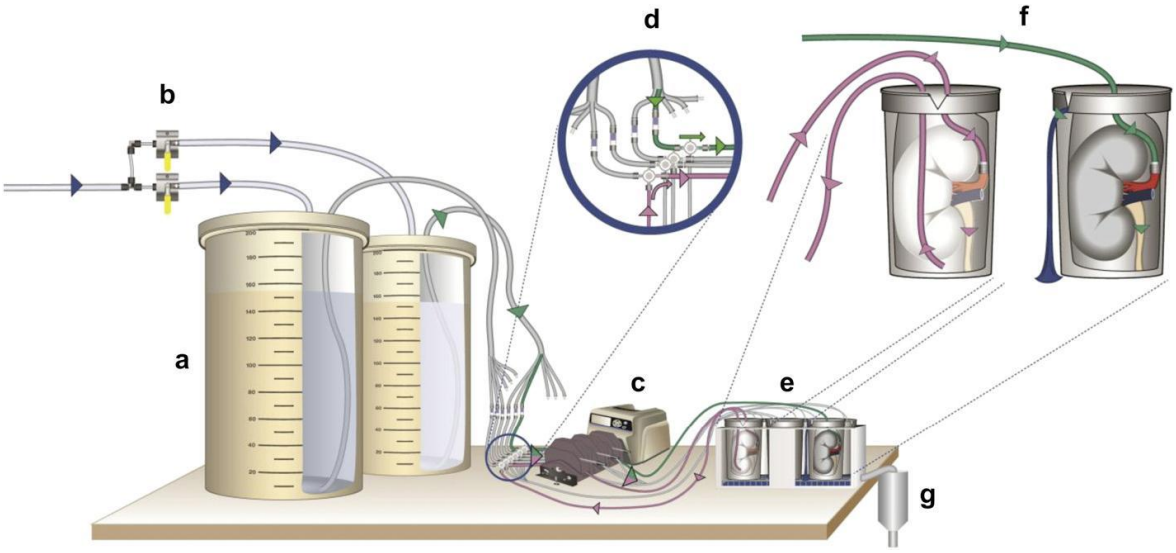


Figura 1.12 Set-up per la decellularizzazione di organi in parallelo.

Questo sistema è quindi in grado di decellularizzare più organi simultaneamente ma mantenendo ognuno in una sua camera di coltura, così da evitare contaminazioni tra una camera e l'altra. Questo set up soddisfa quindi il requisito di scalabilità del processo. Inoltre garantisce che il protocollo sia ripetibile e controllato. A questo sistema non è associato un sistema di controllo e in letteratura non sono stati trovati lavori che presentassero set up per la decellularizzazione uniti a un sistema di controllo.

In conclusione, dall'analisi dello stato dell'arte si può quindi evincere che il sistema di controllo di un bioreattore è diventato indispensabili nel campo della TE sia per dispositivi differenti tra loro (bioreattori a perfusione, bioreattori per stimolazione meccanica, set-up per la decellularizzazione) sia in applicazioni molto diverse tra loro (rigenerazione di tessuti, caratterizzazione biomeccanica di tessuti, decellularizzazione di organi [10]) sia per un ampio range di tessuti (tessuto cartilagineo, osseo e muscolare oltre a vasi e mucose). Si è visto inoltre come associare a una camera di coltura un sistema di controllo che sia in grado di gestire le

sollecitazioni prodotte dagli attuatori (sforzo-deformazione [14], gradiente di pressione [15-17], compressione meccanica [13]) e monitorare i parametri biochimici della coltura (pH, pO_2, temperatura) sia di fondamentale importanza per il fine ultimo dell'ingegneria dei tessuti, ossia realizzare un costrutto funzionale impiantabile in un paziente. Solo tramite un adeguato sistema di controllo, infatti, si possono assicurare ripetibilità e automazione del processo, oltre a garantire il rispetto di standard di qualità ben definiti, specifiche imprescindibili per l'applicazione clinica di qualsiasi terapia innovativa.

2.

Sviluppo della componente HW e SW del sistema di controllo

2.1 Obiettivo del progetto

Il presente lavoro di tesi, svolto presso il laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale (μBS Lab) del Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria del Politecnico di Milano, è volto allo sviluppo di nuovi strumenti e tecnologie che trovano applicazione nel settore di ricerca dell'ingegneria dei tessuti. In particolare, l'obiettivo specifico del presente lavoro è sviluppare un sistema per il monitoraggio e il controllo di dispositivi, quali sistemi di coltura dinamici in grado di applicare stimoli meccanici a tessuti biologici molli attraverso un fluido in pressione. La stimolazione imposta dal sistema di controllo è quindi una stimolazione pressoria dovuta all'azione del fluido che perfonde l'organo o il patch di tessuto. Questo tipo di stimolazione comporta la distensione delle pareti dell'organo o del tessuto sollecitato. Una delle principali caratteristiche del sistema realizzato, sulla base della quale sono state definite molte delle specifiche di progetto, è la versatilità del sistema, intesa come la possibilità del sistema di controllo di adattarsi a differenti set up sperimentali (bioreattore a perfusione, set up per la decellularizzazione di organi interi e campioni di tessuto…) e a diverse applicazioni (stimolazione di tessuti biologici, caratterizzazione delle proprietà biomeccaniche dei tessuti, decellularizzazione…). Il sistema è stato quindi realizzato in modo tale da poter essere applicato in differenti condizioni di lavoro.

Al termine della fase di progettazione, realizzazione e collaudo del sistema di controllo si è poi proceduto al suo effettivo utilizzo, integrandolo in quattro diversi set up sperimentali, ad oggi in uso presso il μBS Lab: i) camera di coltura per la caratterizzazione delle proprietà di distensibilità (compliance) di campioni di vena safena umana da utilizzare come graft per bypass aorto-coronarici; ii) set up per la misura della permeabilità di un patch di tessuto biologico decellularizzato (vescica del modello animale del coniglio); iii) setup per la caratterizzazione

delle proprietà di distensibilità (compliance) dell'organo decellularizzato (vescica del modello animale del coniglio), rispetto all'organo nativo, attraverso test di cistometria; iv) set up per la decellularizzazione dinamica di organo intero (vescica del modello animale del coniglio). Queste prove richiedono una stimolazione del tessuto tramite un gradiente di pressione imposto dal sistema e quindi si adattano alle specifiche che il sistema di controllo realizzato è in grado di fornire.

I dettagli di realizzazione dei quattro diversi set up e i risultati ottenuti verranno presentati nel capitolo 4. Il presente capitolo contiene invece la descrizione delle componenti realizzate nel presente lavoro di tesi che costituiscono il sistema di controllo, sia dal punto di vista hardware che software.

Il sistema di controllo realizzato si può suddividere in due parti complementari: la componente fisica ossia l'hardware (HW), costituita da una pompa volumetrica, un sensore di pressione, un'elettrovalvola pinza-tubo ed i cablaggi per interfacciare questi elementi con il computer (PC), e da una componente software (SW), sviluppata in ambiente LabVIEW® 8.6 (National Instruments) che permette di gestire, ovvero azionare e monitorare, gli elementi dell'hardware.

In generale, come accennato in precedenza, il sistema di controllo è in grado di applicare diversi pattern di stimolazione (intesa come l'azione del fluido che esercita uno stimolo pressorio sul tessuto biologico) e monitorare l'andamento della pressione che agisce sul costrutto, acquisita dal sensore di pressione, in tempo reale. Il sistema di controllo permette quindi di applicare una sollecitazione al tessuto/organo controllata, monitorata e ripetibile; tutte specifiche imprescindibili per un sistema di controllo, come messo in evidenza anche negli esempi riportati nel capitolo precedente. Ciò consente inoltre di standardizzare le procedure sperimentali con potenziali risvolti positivi dal punto di vista dell'ingegnerizzazione o dell'applicazione clinica dei dispositivi sviluppati in laboratorio. Un'ulteriore peculiarità del sistema è quella di consentire il salvataggio automatico delle grandezze fisiche di output (pressione e volume) della stimolazione imposta e di effettuare quindi un'analisi statistica dei dati registrati.

2.2 Hardware

I componenti HW utilizzati in questo progetto sono: i) una pompa volumetrica, ii) un sensore di pressione, iii) un'elettrovalvola pinza-tubo (EV) e iv) i cablaggi necessari per inviare e leggere i segnali di tutti i componenti tramite PC. In questo lavoro di tesi si è provveduto a realizzare il cablaggio per interfacciare la pompa con il PC, il circuito elettrico che gestisce l'EV e il cablaggio per interfacciarla con il PC.

2.2.1 La pompa volumetrica

Nel presente lavoro di tesi è stata utilizzata la pompa volumetrica Ismatec IPC-N 12 (Figura 2.1). La versione utilizzata è dotata di otto rulli in acciaio inossidabile e può alloggiare sottopompa del diametro interno compreso tra 0.13 e 3.17 mm, con spessore di 0.8 mm. Questo permette alla pompa di garantire portate teoriche che variano da 0.39 µl/min fino a 11 ml/min. Inoltre permette di alloggiare fino a 12 sottopompa, così da poter alimentare 12 circuiti idraulici paralleli e tra loro indipendenti [19].

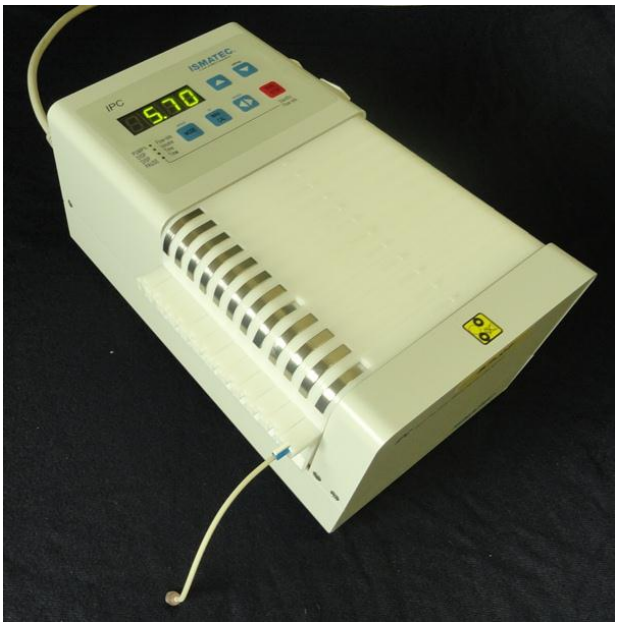


Figura 2.1 Pompa volumetrica Ismatec IPC-N12.

Il meccanismo di funzionamento di questa pompa può essere riassunto come descritto qui di seguito:

- tramite i comandi ed il display della pompa o tramite controllo remoto (ovvero connettendo opportunamente la pompa ad un PC) viene impostata la portata che la pompa deve garantire; la portata può essere impostata imponendo o il numero di giri dei rulli della pompa (RPM%) o il valore in ml/min;
- il valore di portata impostato, tramite un'opportuna conversione gestita dal controllore interno alla pompa, si traduce in un segnale di tensione ad essa proporzionale che va ad agire sul motore della pompa;
- in funzione del valore di tensione, il motore della pompa mette in rotazione un albero ad esso collegato al quale sono connessi gli otto rulli che vanno a comprimere il sottopompa alloggiato nell'apposita sede;

- in entrambe le modalità di impostazione della portata (RPM% o ml/min) il valore impostato si traduce in una velocità di rotazione dei rulli della pompa;
- nel caso si decida di impostare la portata in ml/min, è necessario definire, tramite il menù della pompa, il diametro interno del sottopompa utilizzato: questo passaggio consente alla pompa di calibrare correttamente il valore di volume erogato, per ciascun sottopompa disponibile.

Solitamente si preferisce comandare la velocità di rotazione dei rulli della pompa impostando una portata in ml/min anziché in RPM%, poiché ciò risulta spesso più intuitivo. Nel proseguo del capitolo, quando si farà riferimento al parametro della velocità di rotazione dei rulli della pompa, esso verrà identificato con il nome di *portata impostata* così da etichettare in modo univoco e intuitivo questo parametro.

E' stato scelto questo modello di pompa principalmente per due motivi:

- permette di impostare un ampio range di portate: in tal modo può essere impiegata in diverse applicazioni che richiedono sia portate molto basse (µl/min) sia portate relativamente elevate (ml/min);
- consente il controllo remoto con PC tramite interfaccia seriale (RS232) o analogica (porta a 15 PIN) (Figura 2.2). Il controllo remoto della pompa è ovviamente un requisito imprescindibile per realizzare il sistema di controllo via software.

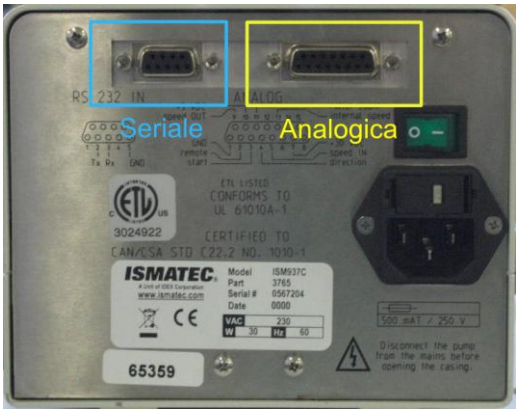


Figura 2.2 Particolare della parte posteriore della pompa: porta seriale (riquadro azzurro) e porta analogica (riquadro giallo).

2.2.1.1 Controllo remoto: interfaccia pompa – PC

Per poter agire direttamente sui parametri di controllo della pompa (ovvero sul valore di tensione del motore) si è scelto di comandare la pompa tramite interfaccia analogica. Questi parametri sono di seguito elencati:

1. start/stop: tramite questo parametro è possibile avviare o arrestare la pompa
2. direzione: consente di selezionare il verso di rotazione dei rulli (orario/antiorario) e quindi la direzione del moto del fluido
3. portata impostata: parametro che va ad agire sulla velocità di rotazione dei rulli della pompa e quindi, in ultima analisi, sul volume di fluido erogato in un determinato intervallo temporale.

Nel presente lavoro di tesi ci si è occupati della realizzazione del cablaggio dedicato per connettere i 15 pin della porta analogica della pompa con una scheda di acquisizione dati (DAQ USB-6211, National Instruments) (Figura 2.3).

Figura 2.3 Scheda di acquisizione dati NI USB-6211.

Tramite la scheda DAQ si è in grado, infatti, di interfacciare la pompa con il PC, andando ad agire sui 3 parametri di controllo della pompa descritti in precedenza. Questo modello di scheda di acquisizione è fornito di [20]:

- 8 canali analogici di input (AI) in modalità di acquisizione differenziale o 16 in modalità di acquisizione riferita a massa capaci di acquisire un segnale di tensione compreso tra -10 V e +10 V
- 2 canali analogici di output (AO) che consentono di fornire una tensione di +10 V ed una corrente di 2mA per canale
- 4 canali digitali di input (P0)
- 4 canali digitali di output (P1) capaci di fornire un segnale TTL, ossia un segnale che può assumere un valore alto (5 V) o basso (0 V)

- 1 canale di uscita a +5V in grado di alimentare componenti elettronici a basso consumo di corrente

Il cablaggio realizzato è schematizzato in Figura 2.4:

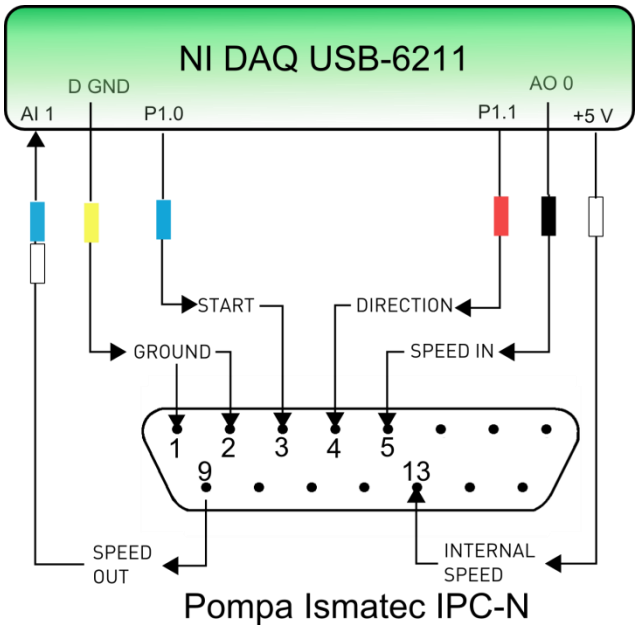


Figura 2.4 Schema connessione pompa – scheda NI DAQ. Per la scheda NI DAQ sono indicati i canali di I/O usati: AI 1 canale di input analogico; D GND ground digitale; P1.x canali di output digitale; AO 0 canale di output analogico. Per la porta analogica della pompa sono indicati i pin cablati con la scheda NI DAQ.

- il pin 1 e 2 della pompa sono cortocircuitati tra di loro e connessi ad un morsetto di ground della scheda NI DAQ (D GND in Figura 2.4) in modo da attivare il controllo remoto della pompa tramite porta analogica;
- il pin 3, che permette il controllo sullo Start e sullo Stop della pompa, è gestito tramite un canale digitale che fornisce un segnale di tipo alto-basso. É cablato con il morsetto P1.0 della scheda NI DAQ (Figura 2.4) corrispondente a un canale di output digitale;
- il pin 4 consente di invertire il verso di rotazione della pompa per passare da una fase di infusione ad una di aspirazione e viceversa. Come il pin 3, è controllato da un canale digitale e perciò è collegato ad un altro canale di output digitale (morsetto P1.1 di Figura 2.4) della scheda NI DAQ;
- il pin 5 consente di variare la portata impostata della pompa. È collegato a un canale di output analogico della scheda NI DAQ (morsetto AO 0 di Figura 2.4) settato per erogare una tensione tra 0 e +5 V. Questa tensione inviata alla pompa si traduce in una variazione di velocità dei rulli tra 0.11 e 11.25 RPM [19], con incrementi minimi dello 0.4%, e quindi in una variazione della portata impostata;

- il pin 9 è un pin di output della pompa tramite il quale si è in grado di acquisire il valore di tensione che agisce sul motore della pompa, proporzionale alla portata impostata. Il segnale varia tra 0 e +10 V. Questo pin è connesso ad un canale di input analogico (morsetto AI 1 di Figura 2.4) della scheda NI DAQ così da poter leggere il valore di tensione tramite PC e convertirlo poi nella portata corrispondente (fase di calibrazione);
- il pin 13, se non connesso ad un ground, abilita il controllo remoto tramite il pin 5 della portata impostata. Se connesso ad un ground, invece, la velocità deve essere impostata dal pannello di controllo (display) della pompa. Il pin 13 è connesso al morsetto +5 V di Figura 2.4 della scheda NI DAQ che fornisce un valore costante di +5 V così da abilitare il controllo remoto tramite il pin 5.

La Tabella 2.1 riassume il cablaggio effettuato per interfacciare la pompa con la DAQ e quindi il computer su cui viene eseguito il SW del sistema di controllo

Porta a 15 Pin Funzione associata (Pin)	**DAQ NI USB-6211** Tipo di canale (morsetto)
Ground (1,2)	D GND (11)
Start-Stop (3)	P1.0 (6)
Direction (4)	P1.1 (7)
Speed in (5)	AO 0 (12)
Speed out (9)	AI 1 (17)
CtrlSpeed (13)	+5V (10)

Tabella 2.1 Tabella riassuntiva della connessione tra i 7 pin cablati della porta analogica della pompa e la scheda NI DAQ USB-6211 connessa al PC con codice colore del cablaggio.

2.2.2 Il sensore di pressione

Oltre alla pompa, il sistema di controllo prevede anche l'impiego di un sensore di pressione così da poter monitorare l'andamento della pressione che agisce sui campioni di tessuto o sugli organi stimolati all'interno della camera di coltura in tempo reale. In questo progetto di tesi sono stati utilizzati due differenti modelli di sensori di pressione, in funzione delle specifiche condizioni sperimentali delle prove effettuate. Entrambi i sensori sono di tipo flow-through e sono quindi integrabili in serie nel circuito idraulico senza dover ricavare diramazioni per la lettura del segnale di pressione in derivazione. I sensori impiegati sono:

i. il sensore Pendotech Press-S-000(Figura 2.5-A) viene impiegato quando le condizioni sperimentali richiedono di monitorare valori di pressioni relativamente elevati (fino a 250 mmHg) [21];
ii. il sensore della Honeywell 26PCA(Figura 2.5-B) consente di acquisire pressioni in un range minore (0-50 mmHg) [22] ma ha una risoluzione maggiore rispetto al sensore della Pendotech (per i calcoli si veda l'appendice A).

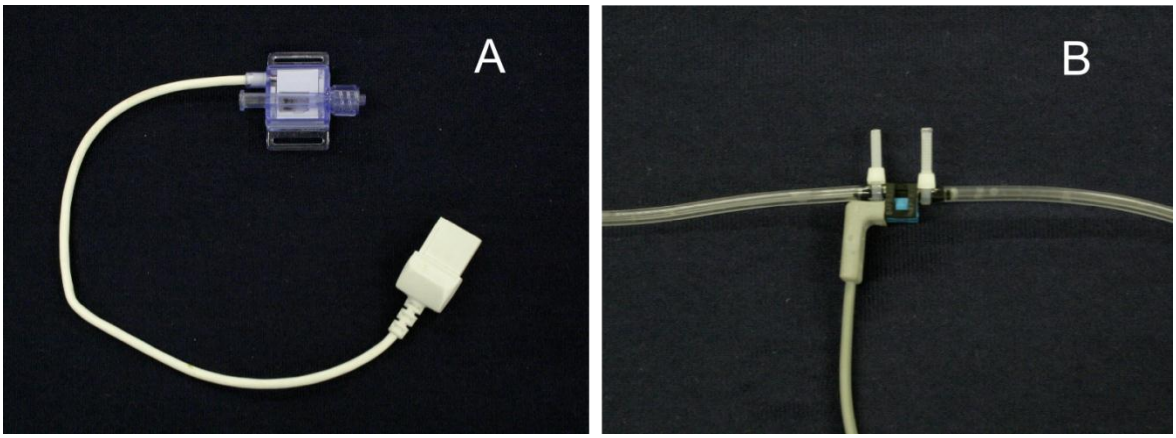


Figura 2.5 Sensore Pendotech Press-S-000 (A); Sensore Honeywell 26PCA (B)

I sensori sono connessi alla scheda NI DAQ USB-6211 tramite un circuito di amplificazione dimensionato al fine di associare il segnale di tensione massimo inviato dal sensore di pressione dell'ordine delle poche decine di mV (16.7 mV per il sensore Honeywell 26PCA e 14.75 mV per il sensore Pendotech Press-S-000) al valore massimo acquisibile dalla scheda NI DAQ (+10 V). In tal modo si sfrutta tutto l'intervallo di valori di tensione acquisibili (Full Scale Range - FSR) della DAQ (0-10 V nel caso di pressioni sempre positive) per l'acquisizione del segnale di pressione, aumentando così la risoluzione del sistema costituito dal sensore e dalla scheda NI DAQ. I dettagli del dimensionamento del circuito di amplificazione ed i passaggi relativi al calcolo della risoluzione del sistema di acquisizione sono riportati in Appendice A. Il circuito di amplificazione per il sensore Honeywell e quello per il sensore Pendotech sono stati realizzati in due precedenti lavori di tesi [23, 24] ed erano già disponibili presso il µBS Lab. Il circuito di amplificazione del sensore Honeywell è stato modificato per permettere l'alimentazione del sensore via software.

I sensori sono stati cablati sulla scheda NI DAQ in modo tale da permettere un'acquisizione riferita a massa (*Refer Single Ended*, RSE), connettendo quindi il pin del segnale in uscita dal sensore con un morsetto di input analogico della DAQ (canale AI 0, morsetto 15). In tal modo il

valore di tensione viene acquisito rispetto ad un morsetto di ground della scheda NI DAQ (canale AI GND, morsetto 28).

2.2.2.1 Alimentazione del sensore di pressione via SW

Per poter acquisire i valori di pressione, il sensore deve essere alimentato e per far ciò una possibilità è utilizzare un alimentatore esterno collegato alla rete elettrica. Al fine però di ridurre l'ingombro del set up sperimentale si è valutata la possibilità di alimentare il sensore tramite il SW del sistema di controllo. La scheda di acquisizione DAQ USB-6211 è fornita di due canali analogici di output, uno dei quali utilizzato per comandare il numero di giri della pompa (AO 0). Si è quindi pensato di alimentare il sensore tramite l'altro canale disponibile (AO 1). I canali analogici di output sono in grado di erogare 2 mA di corrente ciascuno ed una tensione nel range 0-10V [20]. Il sensore Pendotech Press-S-000 richiede un'alimentazione tra 2.5 e 10 V e una corrente di 20 mA [21]. A causa dell'eccessiva richiesta di potenza elettrica, quindi, questo sensore non è alimentabile tramite la scheda NI DAQ e quindi tramite SW e si richiede pertanto l'utilizzo di un alimentatore esterno. Nel caso del sensore Honeywell 26PCA, si è invece riusciti ad alimentarlo tramite la scheda di acquisizione poiché la richiesta di corrente di questo sensore è sufficientemente bassa (< 2 mA) da essere soddisfatta dalla scheda NI DAQ. Tramite quindi il canale analogico di output (AO 1) si è in grado di alimentare il sensore a +10 V, senza la necessità di un alimentatore esterno.

Per alimentare il sensore di pressione Pendotech è stato usato un alimentatore integrato (TXL 015-12S, Traco Power) così da ridurre al minimo gli ingombri del set up. L'alimentatore è in grado di fornire una tensione di +12 V ad una corrente di 1.3 A ed è stato connesso ad un regolatore di tensione (KA78-10, Fairchild Semiconductor) in grado di limitare la tensione in uscita dall'alimentatore a +10 V, ossia la tensione di alimentazione del sensore Pendotech.

2.2.3 L'elettrovalvola pinza-tubo

Come detto in precedenza il sistema di controllo realizzato è stato pensato per essere il più versatile possibile e poter essere utilizzato con diversi tipi di tessuto, con diversi set up e in diverse applicazioni. Uno dei set up con cui il sistema di controllo è stato verificato è volto alla decellularizzazione di organi interi attraverso un protocollo *dinamico* (il set up verrà descritto nel dettaglio nel capitolo 4). Questo set up richiede l'uso, oltre che di pompa volumetrica e di un sensore di pressione, di un'elettrovalvola (EV) che consente di deviare opportunamente il fluido, utilizzato come agente decellularizzante, in opportune linee del circuito idraulico. È stata quindi

integrata nel sistema di controllo anche un'elettrovalvola magnetica di tipo pinza-tubo (075P3MP12-02S della Bio-ChemFluidics) (Figura 2.6).

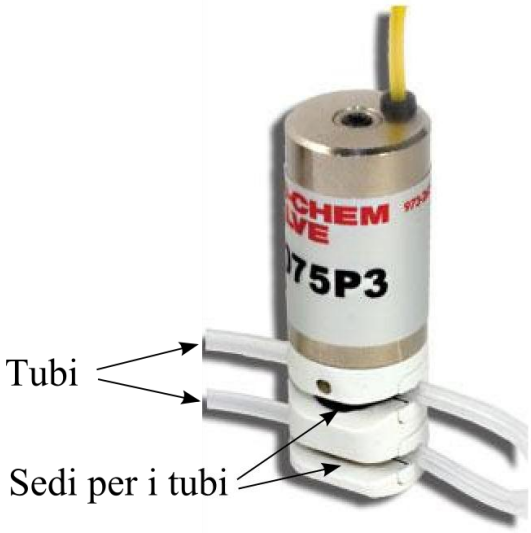


Figura 2.6 Elettrovalvola magnetica a tre vie (075P3MP12-02S - Bio-ChemFluidics)

L'elettrovalvola alloggia due tubi e consente di abilitare il passaggio del fluido alternativamente su un ramo o sull'altro occludendo un tubo e lasciando pervio l'altro. Permette inoltre di mantenere la specifica di sterilità in quanto le parti meccaniche dell'elettrovalvola non entrano mai in contatto con il fluido.

Nel momento in cui si alimenta l'EV, il magnete al suo interno si eccita e commuta il suo stato, provocando quindi l'occlusione del tubo precedentemente pervio e viceversa. Poiché questo modello di EV richiede +12V di alimentazione e consuma 3.6 W di potenza (ha quindi una richiesta di 300 mA di corrente) [25], non è pensabile alimentarla direttamente via SW (paragrafo 2.2.2.1). È stato quindi realizzato un circuito elettrico dedicato e miniaturizzato, mutuato dal campo dei microcontrollori, con il quale è possibile comandare attuatori (l'EV nel nostro caso) che richiedono elevati valori di potenza, attraverso il SW che invece eroga amperaggi limitati. Il circuito realizzato (Figura 2.7) è composto da quattro elementi principali: i) un potenziometro (PTV09A, Bourns 0-1 KΩ), ii) un transistor BJT (BC548C, Semiconductor Components Industries), iii) un relè meccanico (N4100-0.36W-10V, Forward Relays), iv) un regolatore di tensione (KA78-10, Fairchild Semiconductor).

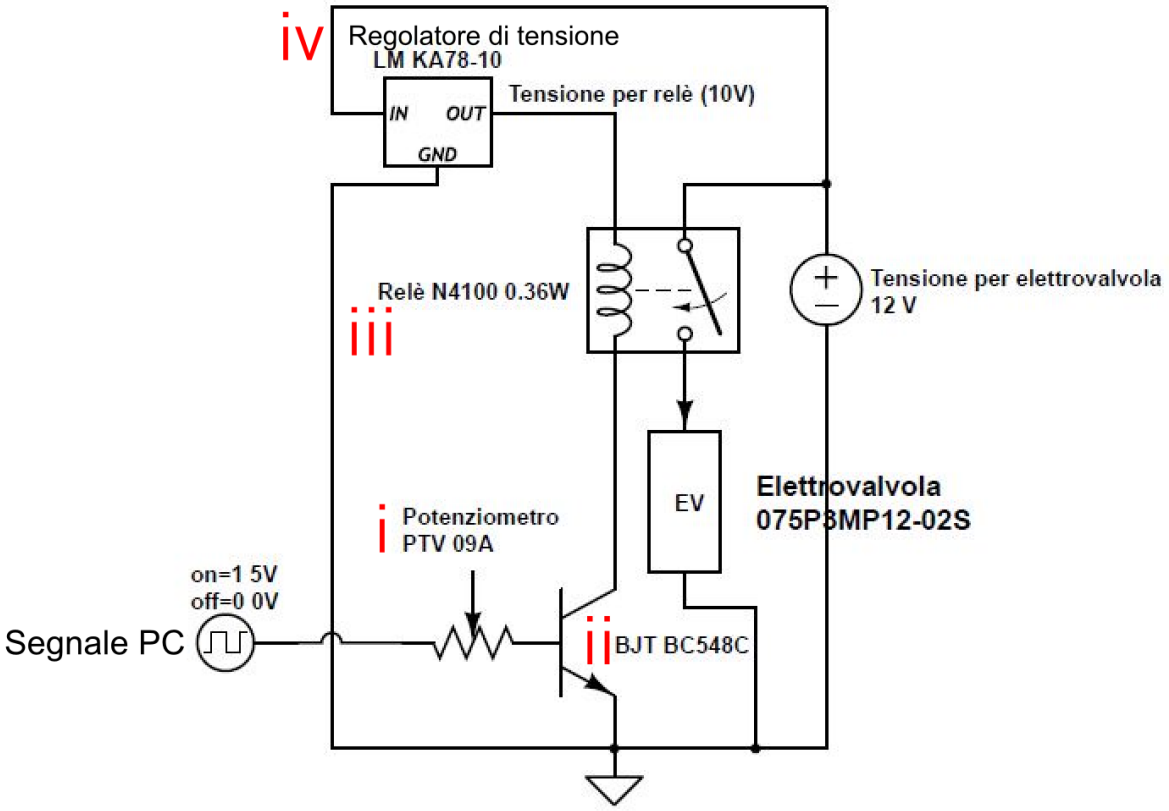


Figura 2.7 Schema del circuito elettrico che regola la commutazione dell'elettrovalvola nei due stati.

Il motivo principale per cui si vuole comandare l'EV tramite il SW è di sincronizzare lo switch dell'EV con le differenti fasi della stimolazione (es: infusione, aspirazione, rest). In tal modo è possibile far commutare l'EV nello stesso istante temporale di passaggio tra una fase di stimolazione e l'altra. Lo scopo del circuito è quindi quello di permettere la gestione dello switch dell'EV tramite un segnale generato dalla scheda NI DAQ e quindi tramite il PC.

La soluzione implementata consiste nel comandare l'EV tramite un relè meccanico, il quale, a seconda della tensione fornita ai capi della sua bobina, permette o meno il passaggio della tensione di alimentazione fornita da un alimentatore integrato (TXL 015-12S, Traco Power) al carico, nel nostro caso l'EV. Il relè quindi funge da interruttore consentendo o meno il passaggio dell'alimentazione al carico e provocando quindi la commutazione del magnete dell'EV. Il relè però richiede comunque troppa potenza (0.36 W) alla tensione di alimentazione nominale (+10 V) ed una corrente di 36 mA per essere comandato tramite la scheda NI DAQ. Il relè deve quindi essere a sua volta controllato tramite un circuito pilota costituito da un transistor BJT e una resistenza (resistenza di guadagno del BJT, potenziometro). Il transistor richiede una corrente in entrata alla base molto bassa (< 5 mA) e una tensione di +5 V; questi valori consentono al transistor di passare dalla fase d'interdizione a quella di saturazione. La commutazione tra queste due fasi permette di aprire o chiudere il circuito. L'uscita digitale della scheda NI DAQ (P1.2)

fornisce un segnale TTL 0-5 V ed una corrente di 5 mA. Questa uscita è quindi collegata, tramite la resistenza di guadagno (potenziometro), alla base del transistor mentre l'emettitore del BJT è collegato a massa. Il collettore del BJT è connesso ad uno dei due pin della bobina del relè mentre l'altro pin della bobina del relè è collegato alla tensione di alimentazione del relè fornita dal regolatore di tensione (LM in Figura 2.7) che è posto a monte del circuito per limitare la tensione fornita dall'alimentatore integrato (+12 V) a quella di alimentazione del relè (+10V). Quando tramite il SW viene inviato un segnale alto (+5 V TTL), il transistor entra in fase di saturazione, scorre quindi corrente nella bobina del relè che eccitandosi chiude il circuito di alimentazione dell'elettrovalvola permettendone l'alimentazione e quindi la commutazione tra un ramo e l'altro del circuito. Quando invece tramite SW viene dato un segnale basso alla base del transistor, questo entra in fase di interdizione e apre il circuito. Così facendo non scorre corrente nella bobina del relè che non si eccita e ciò non fa quindi chiudere il ramo dell'alimentazione collegato all'EV. In questa configurazione il magnete dell'elettrovalvola, non essendo alimentato, non commuta.

In **Figura 2.8** è mostrato l'HW impiegato e sviluppato nel presente lavoro di tesi.

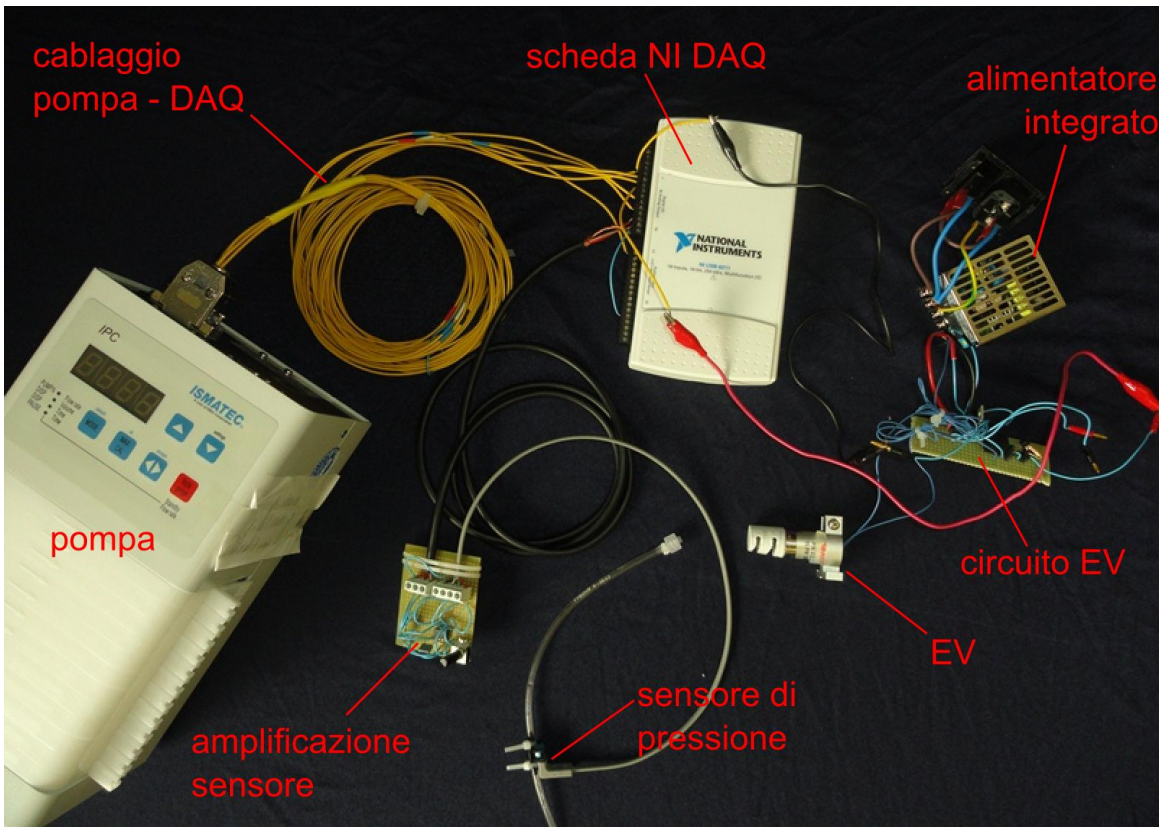


Figura 2.8 Panoramica dell'HW impiegato e/o sviluppato: pompa, scheda NI DAQ, cablaggio pompa – NI DAQ, sensore di pressione, circuito amplificazione del segnale del sensore di pressione, cablaggio sensore - NI DAQ, elettrovalvola (EV), circuito di controllo dell'EV, alimentatore integrato per l'EV e per il sensore di pressione Pendotech.

2.3 Il software del sistema di controllo

Completata la descrizione della parte HW del sistema di controllo passiamo ora alla descrizione della parte SW. Al fine di una corretta progettazione e implementazione di un SW è bene seguire alcuni passaggi fondamentali:

i. la definizione delle specifiche di progetto: questa fase è di fondamentale importanza per definire il campo di applicazione del programma, i requisiti che esso deve soddisfare, le funzionalità che deve offrire e l'utenza al quale è rivolto;
ii. lo sviluppo del SW: in questa fase si procede alla realizzazione del programma attenendosi alle specifiche definite precedentemente;
iii. la verifica di funzionamento del SW: questo stadio dello sviluppo del SW è di cruciale importanza in quanto permette di verificare in che termini il software soddisfi effettivamente le specifiche. Il collaudo viene eseguito di norma utilizzando il SW per il controllo ed il monitoraggio della stimolazione di elementi paradigmatici ed, in generale, molto semplici;
iv. la revisione del SW: una volta effettuato il collaudo si procede alla revisione del programma per correggere gli eventuali errori riscontrati nella fase di verifica. Inoltre, in questa fase, e solo dopo aver collaudato effettivamente il SW, si può decidere se introdurre nuove funzionalità o apportare modifiche a quelle già implementate.

Questo processo di sviluppo SW è valido in tutti i campi di applicazione, non solo per SW di controllo impiegati nell'ingegneria dei tessuti.

Di seguito sono descritte le particolari specifiche di progetto adottate per lo sviluppo del SW oggetto del presente progetto di tesi. Il programma di controllo sviluppato deve prevedere:

- il controllo degli attuatori volti alla stimolazione del tessuto/organo, così da fornire gli stimoli che l'utente ha impostato;
- l'acquisizione del segnale di pressione inviato dal sensore
- un'interfaccia utente chiara e semplice (*user friendly*) così da permettere l'utilizzo del SW anche ad utenti non particolarmente esperti;
- il controllo sui parametri di output della stimolazione (pressione, volume,...) in grado di agire sui parametri di input del sistema stesso al fine di mantenere i parametri di stimolazione all'interno di un range preimpostato;
- la visualizzazione *real-time* dell'andamento dei parametri di stimolazione (pressione, volume...);

- la registrazione dei valori dei parametri di stimolazione così da permettere un'analisi dei dati a posteriori (post-processing);
- caratteristiche di modularità così da poter integrare nuove funzionalità o modificare quelle preesistenti in funzione di nuove richieste da parte dell'utilizzatore;
- caratteristiche di robustezza e affidabilità: deve garantire che le operazioni impostate vengano eseguite correttamente per tutta la durata della stimolazione;
- controlli di sicurezza in grado di arrestare repentinamente la stimolazione in caso di eventi inattesi.

2.3.1 Progettazione del software di controllo

Dopo aver descritto nel paragrafo precedente le specifiche generali che il sistema realizzato deve rispettare, andiamo ora ad illustrare nel dettaglio le caratteristiche del SW di controllo sviluppato nel presente lavoro di tesi. Nei paragrafi successivi del presente capitolo verranno descritte le diverse funzioni di cui esso è dotato e le modalità con cui l'utente imposta i vari parametri della stimolazione attraverso l'interfaccia grafica.

Lo scopo principale del programma è quello di controllare gli attuatori e acquisire i segnali dai sensori presenti nel sistema attraverso i canali di input ed output (I/O) della scheda di acquisizione dati (NI DAQ) che a sua volta si interfaccia con il programma realizzato.

L'utente può scegliere tra tre modalità di controllo (stimolazione manuale, stimolazione automatica e stimolazione limitata in pressione) e decidere il pattern di stimolazione impostando diverse combinazioni delle tre fasi (infusione, aspirazione e rest) e i valori di portata e durata delle fasi stesse. Inoltre il software è in grado di utilizzare un parametro di output della stimolazione, la pressione, come parametro di controllo sulla stimolazione in atto. In tal modo il SW è in grado di mantenere la stimolazione del costrutto biologico all'interno di un *range* di pressioni predefinito dall'utente. Il programma è in grado inoltre di registrare i valori di pressione e volume nel tempo e di salvarli automaticamente in un file di testo sul PC. Questo permette all'utente di elaborare i dati successivamente per analizzare i risultati della stimolazione. Quest'analisi può essere fatta dall'utente tramite altri programmi (es. Microsoft Excel) oppure attraverso il SW stesso. Infatti, il programma consente all'utente di richiamare i file precedentemente salvati ed eseguire un'analisi statistica automatica dei dati.

2.4 Ambiente di sviluppo software: LabVIEW

Alla luce delle specifiche di progetto introdotte nel paragrafo precedente, si è deciso di sviluppare il programma nell'ambiente di programmazione LabVIEW® 8.6.

LabVIEW® (abbreviazione di Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench) è l'ambiente di sviluppo software prodotto da National Instruments (Austin, TX, USA). Questo linguaggio di programmazione si distingue dagli altri (C++, Java) poiché si basa su un approccio grafico; viene infatti definito linguaggio grafico (G-Language). Un programma e un sottoprogramma realizzato in LabVIEW® sono chiamati rispettivamente VI (Virtual Instrument) e Sub-VI e possono essere salvati in formato binario visualizzabile e compilabile solo tramite LabVIEW®[26].

Nella programmazione in LabVIEW® le varie funzioni delle strutture dati (matematiche, logiche, cicli condizionati…) sono rappresentate da icone e oggetti grafici, ognuno dei quali possiede funzioni diverse, e sono connesse tra loro tramite linee (wire), così da formare un diagramma di flusso dei dati. In LabVIEW® infatti, l'ordine di esecuzione delle operazioni è definita da queste connessioni che connettono monodirezionalmente il flusso di dati tra più blocchi funzionali. Dal momento che i dati possono anche scorrere in parallelo tra loro, attraverso blocchi funzionali diversi uniti da differenti linee, il linguaggio di programmazione gestisce autonomamente questa condizione attraverso una specifica funzione denominata *multithreading* [26], che permette di suddividere il carico di lavoro su più thread che possono essere eseguiti in parallelo.

L'ambiente di programmazione è composto da due differenti pannelli: il pannello frontale (front panel) e il diagramma a blocchi (block diagram).

Il primo è l'interfaccia utente del VI ed è composto da controlli e indicatori che costituiscono i terminali interattivi e grafici delle variabili d'ingresso e d'uscita. Per quanto riguarda i controlli si può scegliere tra pulsanti, matrici, manopole, cursori tramite i quali si possono fornire gli input allo schema a blocchi del VI. Gli indicatori invece sono sotto forma di grafici, tabelle, caselle di testo, matrici. Simulano i dispositivi di uscita degli strumenti reali, i loro pannelli di interfaccia utente ad esempio, e mostrano i valori che lo schema a blocchi acquisisce dall'esterno (segnale di pressione inviato da un sensore) o genera (risultato di una funzione matematica implementata nel block diagram).

Nel diagramma a blocchi si costruisce effettivamente il SW. In questo pannello si connettono i controlli e gli indicatori del front panel attraverso le linee di collegamento, creando così il flusso di dati del programma. Si implementa inoltre l'architettura del software attraverso cicli (for, while, if) ed operatori matematici, booleani e di confronto.

La scelta di sviluppare il software in ambiente LabVIEW® è dovuta principalmente a tre motivi:

i. facilità di realizzare un'interfaccia utente chiara, semplice ed intuitiva;

ii. possibilità di interfacciarsi direttamente con la scheda NI DAQ della stessa casa (National Instruments) mediante appositi drivers, Daq-Mx, che consentono un accesso diretto ai canali di input e output della scheda di acquisizione;

iii. è un ambiente diffuso nel laboratorio in cui è stato svolto il presente lavoro di tesi e quindi darà la possibilità, non solo ad altri utenti esperti, di apportare modifiche o adattare il programma in risposta alle future esigenze.

2.5 Interfaccia Utente

In questo paragrafo s'illustreranno le funzionalità del SW realizzato dal punto di vista dell'interfaccia utente. Per quanto riguarda i dettagli dell'architettura del SW ovvero come il programma esegue le varie funzioni implementate, queste saranno descritte in dettaglio nel capitolo 3.

L'interfaccia utente del programma realizzato è stata studiata in modo tale da consentire sia ad utenti esperti che non di poter utilizzare il SW di controllo. Sono state quindi adottate specifiche di semplicità, chiarezza ed intuitività così da rendere l'interfaccia *user friendly*. Per facilitarne l'utilizzo, l'interfaccia è suddivisa in cinque pannelli, ciascuno dei quali gestisce diverse funzioni ed impostazioni del programma (Figura 2.9). La sequenza con cui sono stati ordinati i pannelli è stata scelta per ricalcare l'ordine logico delle operazioni che un utente deve eseguire per impostare i parametri di stimolazione, far partire la prova, monitorare l'andamento della stessa ed elaborare i dati ottenuti.

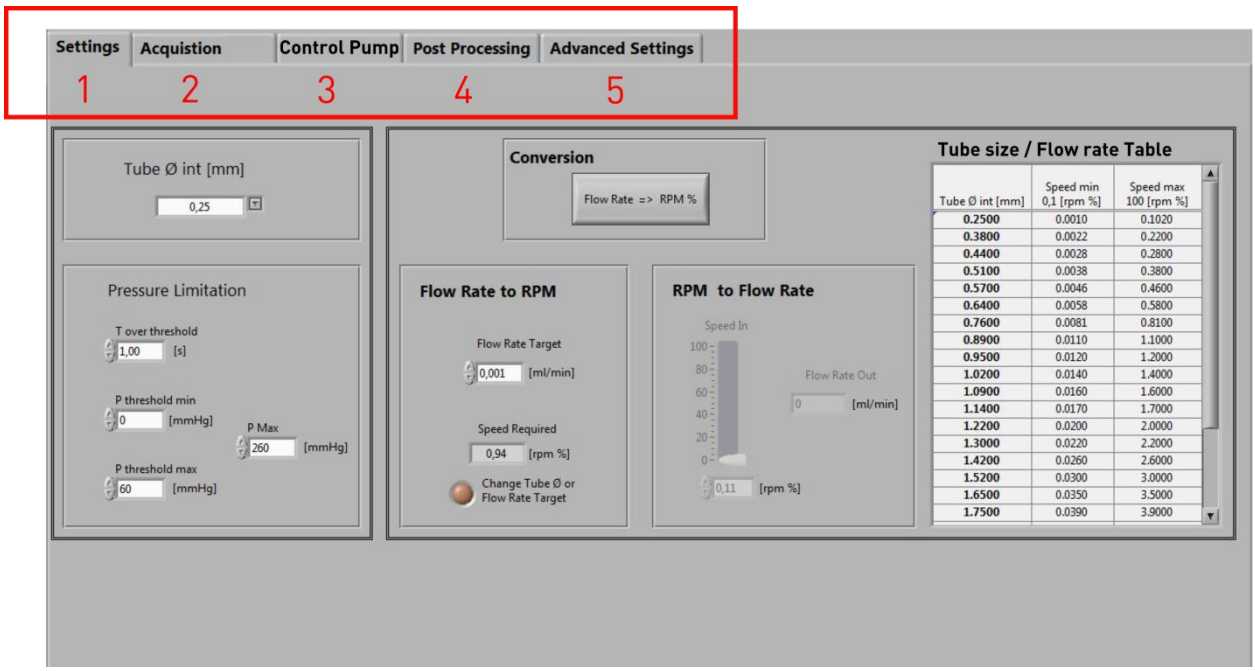


Figura 2.9 Interfaccia utente del SW; dettaglio dei cinque pannelli presenti: Settings (1), Acquistion (2), Control Pump (3), Post Processing (4), Advanced Settings (5).

i. Pannello #1: *Settings*. In questo pannello l'utente imposta alcuni parametri della stimolazione come il diametro del sottopompa o la soglia massima e minima nel caso di stimolazione in limitazione di pressione. Questi sono i primi parametri da definire in quanto non andranno più variati una volta definito il protocollo di stimolazione della campagna sperimentale
ii. Pannello #2: *Acquisition*. Questo pannello è dedicato alla calibrazione del sensore. Infatti, prima di iniziare un qualsiasi tipo di prova è necessario calibrare il sensore di pressione, ovvero convertire il segnale di tensione (Volt) che esso genera in un segnale di pressione (Pa, mmHg, bar, ...).
iii. Pannello #3: *Control Pump*. È il pannello principale del SW: l'utente imposta la modalità di controllo (manuale, controllo in volume, limitata in pressione), il pattern di stimolazione ed i suoi parametri (sequenza, portate e durata di ciascuna fase). Vi sono poi le finestre grafiche che mostrano l'andamento della pressione e del volume nel tempo e della pressione rispetto il volume.
iv. Pannello #4: *Post processing*. Questo pannello consente di eseguire un'analisi statistica dei valori di pressione e volume registrati. Nella sequenza delle operazioni logiche da eseguire, l'utente accede a questo pannello una volta che ha concluso la stimolazione. Quindi questo pannello viene immediatamente dopo il pannello di controllo della stimolazione (Pump Control).
v. Pannello #5: *Advanced Settings*. Questo pannello è dedicato solo ad utenti esperti. È possibile selezionare i canali di I/O sulla scheda NI DAQ, la frequenza e la modalità di acquisizione del segnale di pressione ed altri parametri che non riguardano direttamente i parametri della stimolazione.

2.5.1 Il pannello Settings

Il pannello Settings (Figura 2.10) è diviso sostanzialmente in tre aree.

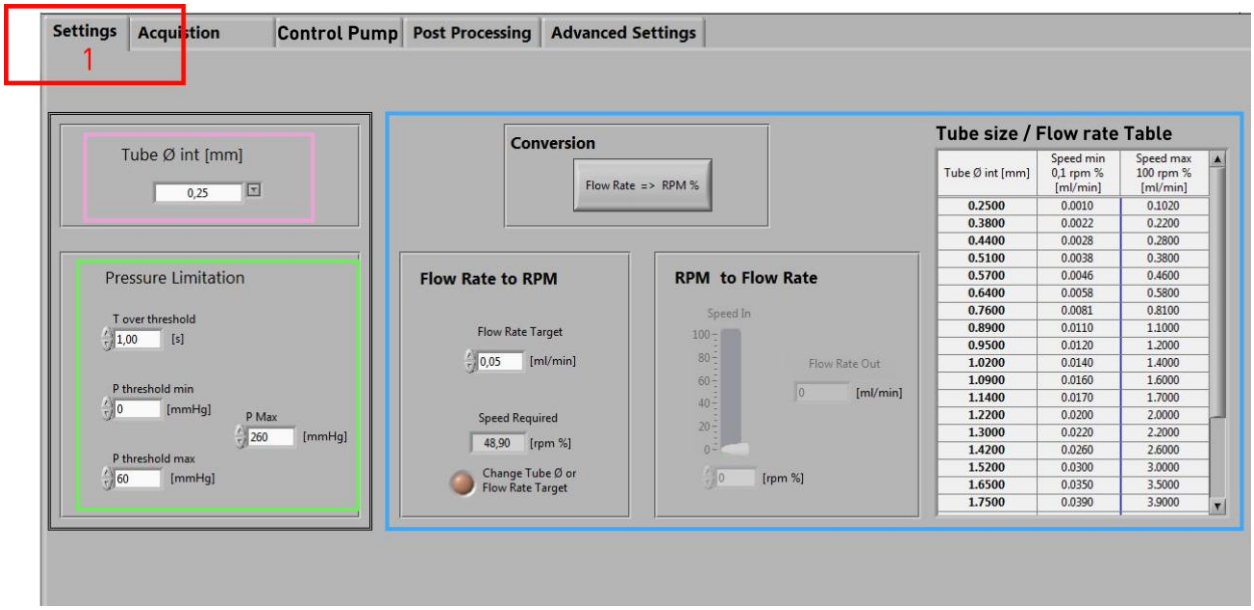


Figura 2.10 Pannello Settings: riquadro rosa: selezione del diametro interno del sottopompa utilizzato; riquadro verde: soglie di pressione massima e minima relative alla stimolazione in limitazione di pressione; riquadro azzurro area di conversione della portata da RPM% a ml/min

Il primo parametro che l'utente deve impostare è il diametro del sottopompa utilizzato (riquadro rosa di Figura 2.10). Infatti, il SW utilizza per ogni diametro del sottopompa opportune curve di calibrazione che consentono di convertire il valore della portata impostata dall'utente in un segnale di tensione che va ad agire sul motore della pompa determinando la velocità di rotazione dei rulli e quindi il volume di fluido erogato.

L'altro set di parametri che l'utente deve impostare in questo pannello è quello riguardante la stimolazione limitata in pressione (riquadro verde di Figura 2.10). Come sarà descritto più approfonditamente nel paragrafo 2.5.3.1.3, la modalità limitata in pressione richiede di impostare alcuni parametri:

- il valore di soglia minimo del range di pressioni;
- il valore di soglia massimo del range di pressioni;
- il tempo oltre soglia, ossia il tempo minimo per cui il valore della pressione deve mantenersi oltre la soglia impostata prima di attivare l'effettivo cambio fase;
- il valore di pressione massima, valore di sicurezza che se raggiunto provoca l'arresto immediato della pompa.

Il pannello Settings offre poi all'utente un'area (riquadro azzurro di Figura 2.10) dedicata alla conversione tra i due parametri di controllo sulla velocità dei rulli che l'utente ha a disposizione

(portata in RPM% e ml/min). E' presente una tabella riassuntiva che riporta i sottopompa disponibili e i loro rispettivi range di portata (Tube Size / Flow Rate Table di Figura 2.10). Questo permette all'utente di capire che tubo deve usare per ottenere il valore di portata desiderato. Vi è poi uno strumento di conversione vero e proprio che permette di convertire il valore di RPM % in ml/min e viceversa. La conversione permette di capire che valore di RPM% sia necessario usare per ottenere la portata in ml/min desiderata. Se la portata impostata richiede un numero di giri superiore al 100% o inferiore allo 0%, il software segnala la necessità di cambiare sottopompa o ridurre la portata impostata.

2.5.2 Il pannello Acquisition

Il secondo pannello dell'interfaccia utente è dedicato all'acquisizione del segnale di pressione (Figura 2.11).

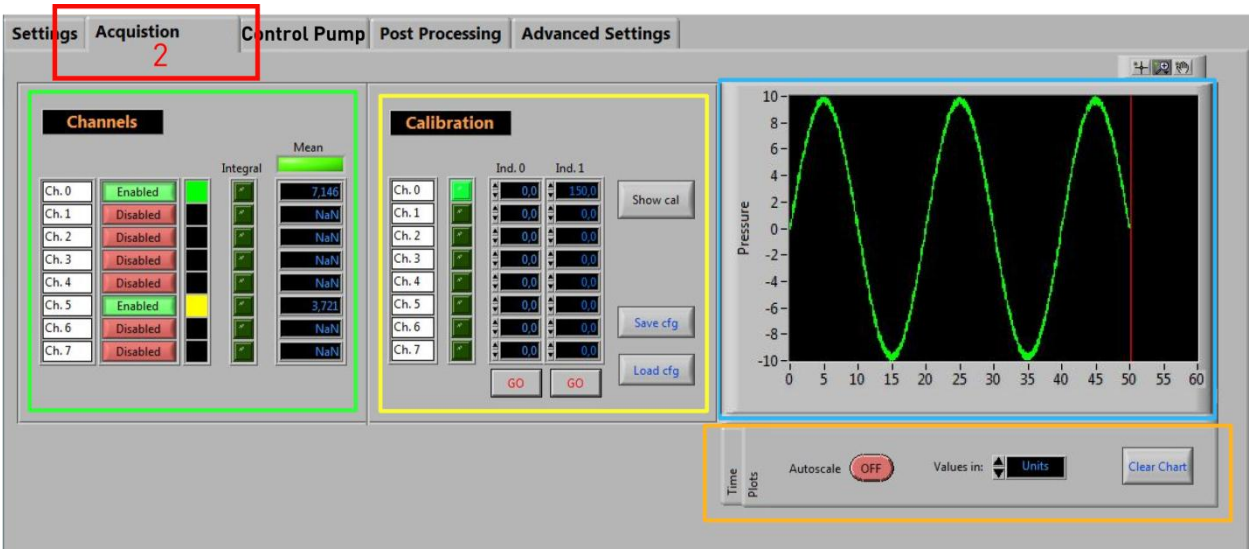


Figura 2.11 Pannello di acquisizione: riquadro verde: attivazione canali di acquisizione della scheda NI DAQ; riquadro giallo: area di calibrazione del sensore di pressione; riquadro azzurro: grafico dell'andamento del segnale di pressione acquisito; riquadro arancione: strumenti associati al grafico

La parte del SW dedicata all'acquisizione del segnale di pressione è basata su un VI preesistente nel laboratorio µBS Lab. Si è provveduto ad integrarlo nel SW realizzato e ad adattarlo alle nuove esigenze.

In questo pannello l'utente può scegliere quali canali di input vuole visualizzare; il SW permette di acquisire fino ad otto differenti segnali di pressione attraverso otto dei sedici canali di ingresso (AI) disponibili sulla scheda NI DAQ. Nel riquadro verde di Figura 2.11, infatti, si vede come sia possibile abilitare o disabilitare i canali di acquisizione del segnale di pressione e visualizzarne o meno il valore medio. Bisogna ricordare che uno degli otto canali AI disponibili

sulla scheda NI DAQ è dedicato all'acquisizione del segnale di tensione che esce dalla pompa (proporzionale alla portata). Questo canale non sarà quindi disponibile per l'acquisizione del segnale di pressione.

Questo pannello permette inoltre di calibrare il segnale di pressione del sensore. Infatti, il sensore invia al software tramite la scheda NI DAQ un segnale di tensione proporzionale alla pressione che il fluido esercita sul sensore stesso. Questo valore deve essere poi convertito in un valore valutato in un'unità di misura di pressione (mmHg). Questa procedura si effettua tramite la calibrazione (riquadro giallo di Figura 2.11). Attivando la calibrazione del canale desiderato compare un grafico (riquadro azzurro di Figura 2.11) che mostra l'andamento del segnale di pressione nel tempo. Per effettuare la calibrazione, si impone un valore noto di pressione, ad esempio tramite un manometro, e si scelgono due punti di lavoro, generalmente la pressione atmosferica e il valore massimo a cui si pensa di giungere nel corso della stimolazione. Per ogni canale che l'utente ha abilitato e intende utilizzare, si impostano questi due valori nella colonna *Ind. 0* e *Ind. 1*; si porta il manometro alla pressione impostata su *Ind. 0* e si preme *GO* sotto la colonna di *Ind. 0*; si ripete la stessa procedura per il valore impostato su *Ind. 1*. Per eliminare eventuali offset di pressione che si possono generare a seguito del riempimento del circuito idraulico si può agire manualmente sulla calibrazione appena effettuata tramite il pulsante *Show cal*. Premendo questo pulsante, infatti, il software mostra una finestra all'utente dove sono riportati i coefficiente delle rette di calibrazione (pendenza e intercetta della retta). L'utente può quindi andare ad agire sull'intercetta così da eliminare manualmente il valore di offset che il sensore rileva. Il software permette inoltre di salvare e richiamare in un secondo momento le calibrazioni effettuate (*Save cfg, Load cfg*) così da non dover ricalibrare il sensore ogni volta.

Al grafico nel riquadro azzurro di Figura 2.11, ma anche a tutti gli altri grafici presenti nell'interfaccia utente, sono associati una serie di controlli (riquadro arancione di Figura 2.11 e di Figura 2.12).

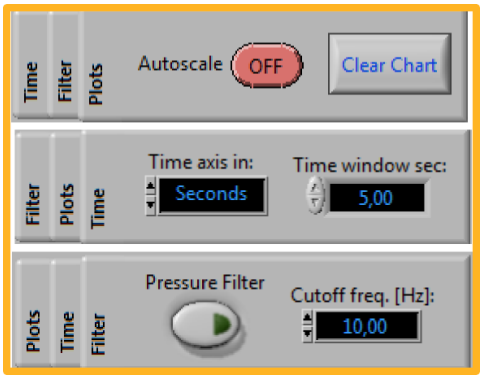


Figura 2.12 Opzioni di controllo dei pannelli grafici.

In generale è presente un comando per il refresh della finestra del grafico (*Clear Chart* di Figura 2.12), uno per abilitare l'autoscale dell'asse delle ordinate così che si autoimposti a seconda del range di valori visualizzato. L'asse delle ascisse può inoltre essere impostato per visualizzare il tempo o il numero di campioni acquisiti nel tempo (in funzione della frequenza di acquisizione impostata nel pannello #5) (Figura 2.12); per entrambe le configurazioni è possibile scegliere rispettivamente la finestra temporale o il numero di campioni visualizzati. Vi è anche la possibilità di attivare un filtraggio del segnale visualizzato tramite un filtro (Figura 2.12) passa basso con una frequenza di taglio impostabile dall'utente al fine di ridurre il rumore elettrico che "sporca" il segnale che si vuole acquisire. Questo filtro agisce solo sulla rappresentazione grafica del segnale e non sui dati acquisiti. Infine, nel grafico del pannello di Figura 2.11 è possibile scegliere se visualizzare il valore del sensore in Volt (tensione) o in una unità di misura della pressione, tipicamente in mmHg nel caso di applicazioni biomediche.

2.5.3 Il pannello Control Pump

Questo pannello può essere visto come il cuore di tutto il programma. Qui sono concentrati i controlli sui parametri della stimolazione che si vuole applicare e i grafici che mostrano l'andamento delle variabili di input e di output della stessa. Dividiamo quindi questo pannello in tre macro aree: l'area di stimolazione (riquadro verde di Figura 2.13), l'area di monitoraggio della stimolazione (riquadro viola di Figura 2.13) e l'area accessoria (riquadro giallo di Figura 2.13).

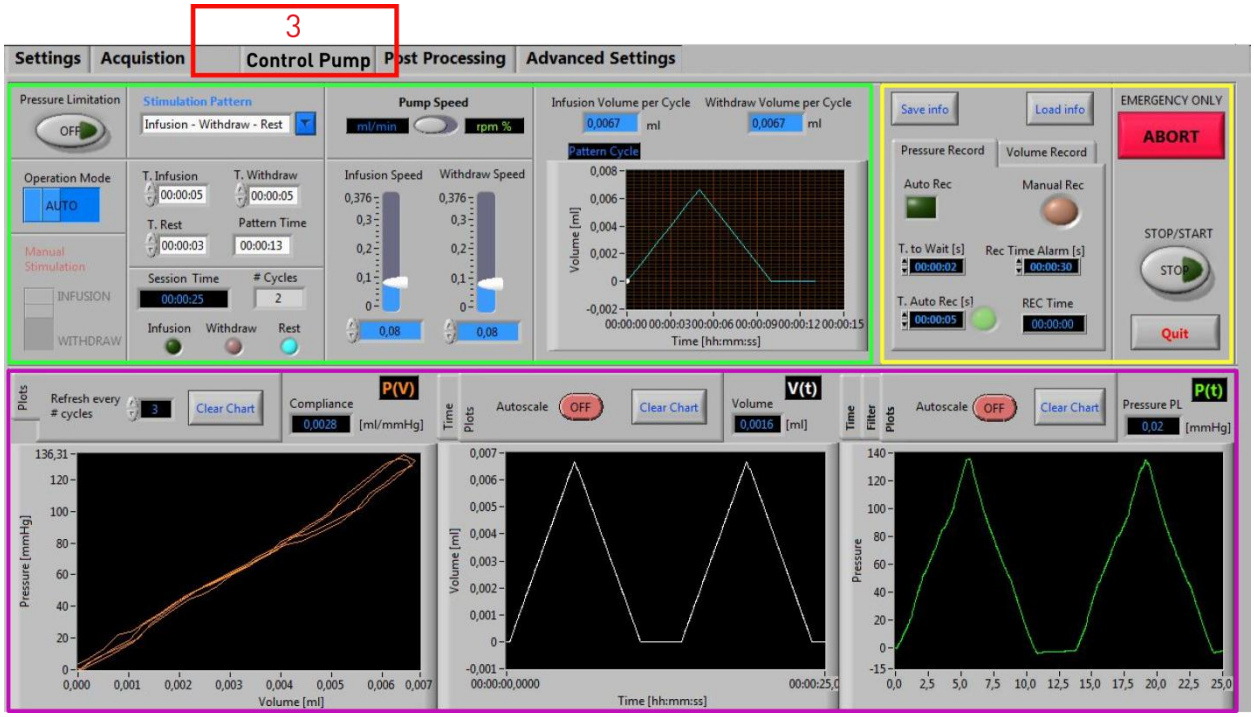


Figura 2.13 Pannello di controllo. Riquadro verde: area di stimolazione; riquadro viola: area di monitoraggio della stimolazione; riquadro giallo: area accessoria.

2.5.3.1 Area di stimolazione

In quest'area del pannello (riquadro verde di Figura 2.13) l'utente imposta tutti i parametri della stimolazione. Prima di tutto l'utente sceglie la modalità di controllo tra le tre che il software mette a disposizione: i) stimolazione in controllo di volume in modalità manuale, ii) controllo in volume in modalità automatica e iii) stimolazione in limitazione di pressione in modalità automatica. Descrivendo le modalità, qui di seguito, andiamo ad evidenziare anche i controlli presenti nell'area di stimolazione.

2.5.3.1.1 Controllo in volume: modalità manuale

In questa modalità (Operation Mode – Manual in Figura 2.14-A) l'utente controlla manualmente tutti e tre i parametri di controllo delle pompa: Start-Stop, verso di rotazione, portata impostata (in ml/min o RPM%).

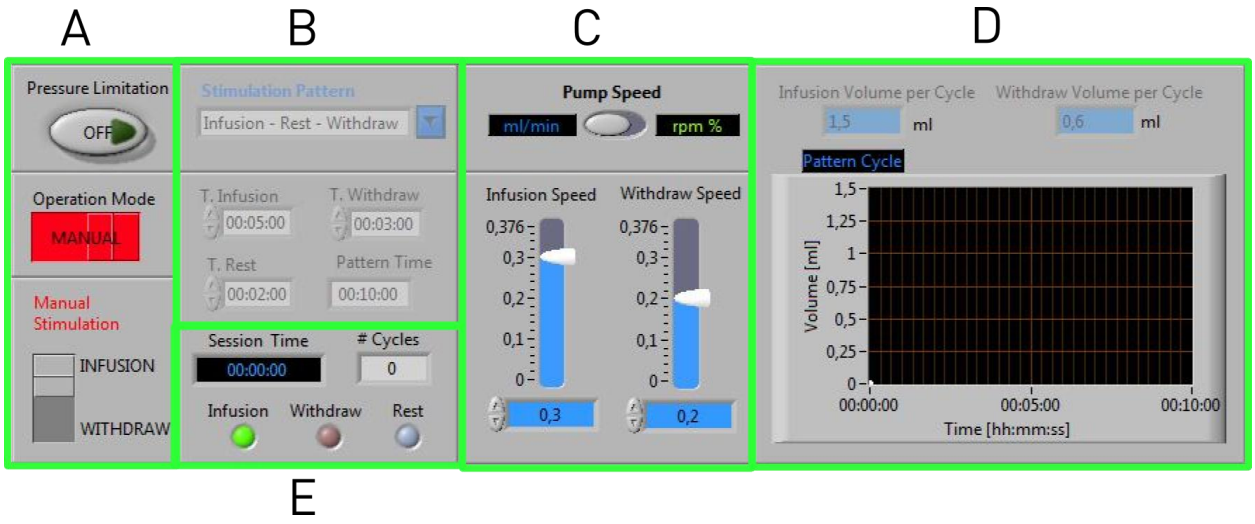


Figura 2.14 Area di stimolazione: modalità manuale suddivisa in 5 blocchi (A-E).

In questa modalità non sono presenti cicli preimpostati o controlli sulla pressione (Pressure Limitation: Off). Infatti, quando l'utente seleziona la modalità manuale, i controlli per la selezione del pattern di stimolazione e le durate delle relative fasi si disattivano automaticamente (Figura 2.14-B). È la modalità più semplice delle tre implementate ed è pensata per fasi precedenti o successive alla stimolazione come il riempimento del circuito o l'eventuale ricambio del medium in caso di applicazioni di colture cellulari. Inoltre può essere utile durante le prove preliminari per determinare il set di parametri ottimali per la stimolazione che si vuole eseguire, che verranno poi impostati nella modalità automatica.

La direzione di rotazione dei rulli della pompa è controllata dal comando *Manual Stimulation* (Figura 2.14-A) che permette di passare dalla fase di infusione a quella di aspirazione e viceversa.

Nell'area C di Figura 2.14 l'utente trova la possibilità di selezionare il valore della portata di infusione e di aspirazione, separatamente (in RPM% o ml/min). Come detto, settando la portata in ml/min, la velocità dei rulli della pompa si auto-adatta al range di portate del sottopompa impostato nel pannello *Settings*.

Il blocco D (Volume infuso per ciclo e pattern del ciclo) del riquadro verde in Figura 2.14 non è attivo in questa modalità e verrà spiegato di seguito.

L'ultimo blocco di questo pannello è il blocco E dove sono integrati due diversi indicatori. Il primo, session time, mostra da quanto tempo è stata avviata la stimolazione: è un contatore che si attiva quando si preme Start e si ferma quando si preme Stop. La seconda informazione visualizzabile è relativa alla fase della stimolazione: tramite tre led di colore differente, l'utente può vedere immediatamente in che fase del ciclo ci si trova (led verde attivo in infusione, rosso in aspirazione, azzurro in rest).

2.5.3.1.2 Controllo in volume: modalità automatica

Questa modalità (Figura 2.15), a differenza di quella manuale, consente all'utente di scegliere che pattern di stimolazione applicare, in termini di sequenza delle tre fasi, durata e portata di ciascuna fase.

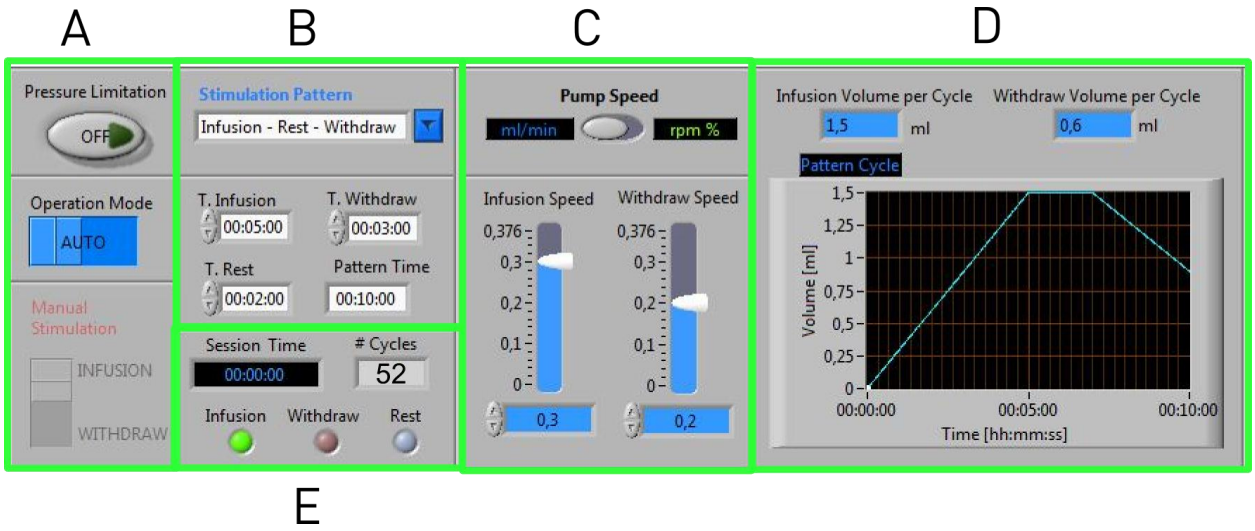


Figura 2.15 Area di stimolazione: controllo in volume modalità automatica. Pattern: infusione-rest-aspirazione; tempi fasi: 5 minuti (infusione), 3 minuti (aspirazione), 2 minuti (rest); portate: 0.3 ml/min (infusione), 0.2 ml/min (aspirazione).

Il programma dà la possibilità di scegliere tra quattro diversi pattern di stimolazione (blocco B in alto di Figura 2.15):

1. Infusione – Rest
2. Infusione – Aspirazione
3. Infusione – Aspirazione – Rest
4. Infusione – Rest – Aspirazione

Per ogni singola fase del pattern di stimolazione l'utente ne imposta la durata (blocco B in basso di Figura 2.15) e per le fasi d'infusione e aspirazione la portata (blocco C in alto di Figura 2.15); nell'esempio di Figura 2.15 pari a: Pattern: infusione-rest-aspirazione; tempi fasi: 5 minuti (infusione), 3 minuti (aspirazione), 2 minuti (rest); portate: 0.3 ml/min (infusione), 0.2 ml/min (aspirazione). Il SW poi calcola, partendo da questi dati, il volume in ml che sarà infuso e aspirato in ogni ciclo. Inoltre nella finestra grafica mostrata nel blocco D di Figura 2.15 viene visualizzata la stimolazione che si è impostata, tenendo conto del pattern e delle durate e delle portate di ciascuna fase. L'utente così è in grado immediatamente di accorgersi se ha costruito ad esempio un ciclo simmetrico o un ciclo dove il volume di infusione è maggiore di quello di aspirazione. Inoltre, una volta avviata la prova, un cursore sul grafico fa vedere in tempo reale in che fase della stimolazione ci si trova. Oltre all'indicazione sul tempo trascorso (session time) e la fase attiva (tre led luminosi), in questa modalità è attivo anche un contatore che segnala il numero di cicli di stimolazione eseguiti fino a quel momento (blocco E di Figura 2.15).
Questa modalità permette quindi un controllo in volume automatico della stimolazione impostata dall'utente: il SW determina il passaggio da una fase alla successiva in funzione del valore di volume infuso/aspirato (fase di infusione e aspirazione) o del tempo trascorso (fase di rest).

2.5.3.1.3 Stimolazione in limitazione di pressione: modalità automatica

Questa modalità è fondamentale per quelle applicazioni che richiedono un controllo molto accurato sul valore di pressione a cui è sottoposto il campione in fase di stimolazione.
Come nella modalità automatica in controllo di volume, l'utente è in grado di selezionare uno tra i 4 pattern di stimolazione disponibili (blocco B di Figura 2.16) e di settare la portata di infusione e aspirazione in maniera indipendente (blocco C di Figura 2.16). In questa modalità la durata delle singole fasi di infusione /aspirazione è slegata da un controllo sul tempo o sul volume infuso/aspirato ma dipende dal valore di pressione acquisito dal sensore. Ovviamente, la fase di rest rimane legata al controllo della variabile tempo.

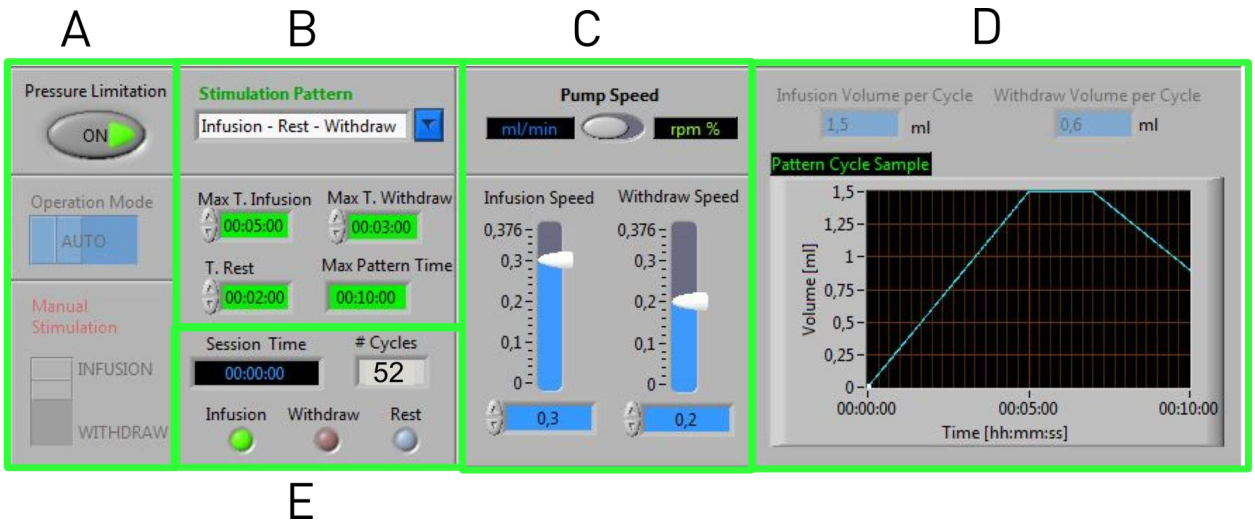


Figura 2.16 Area di stimolazione: modalità in limitazione di pressione. Pattern: infusione-rest-aspirazione; tempi fasi massimi: 5 minuti (infusione), 3 minuti (aspirazione), 2 minuti (rest); portate: 0.3 ml/min (infusione), 0.2 ml/min (aspirazione).

La limitazione in pressione consente di mantenere la stimolazione all'interno di un range di pressioni deciso dall'operatore (paragrafo 2.5.1): il SW dà la possibilità di impostare le due differenti soglie di pressione, ovvero il valore massimo e il valore minimo. In questa modalità, il programma monitora l'andamento della pressione e determina il passaggio alla fase successiva del pattern di stimolazione nel momento in cui si è raggiunta una delle due soglie. Inoltre l'utente può impostare il tempo oltre soglia, ossia per quanto tempo la pressione debba mantenersi al di sopra (o al di sotto) della soglia impostata prima di cambiare effettivamente fase. Questa verifica da parte del programma evita che il sistema di controllo cambi fase erroneamente a causa d'indesiderati *spike* di pressione dovuti, ad esempio, alla temporanea e involontaria compressione di un tubo del circuito idraulico da parte dell'operatore. Esiste poi la possibilità di impostare dei valori di tempo massimi oltre i quali se non venisse raggiunto il valore di pressione desiderato, il programma forza il passaggio alla fase successiva (blocco B di Figura 2.16). Questo ulteriore controllo sul tempo permette di uscire da situazioni di stallo; se ad esempio ad un certo punto della stimolazione il tessuto non riuscisse più a raggiungere il valore di pressione desiderato perché sono variate le sue proprietà meccaniche (si pensi alla stimolazione di patch di tessuto ricellularizzato in cui col procedere della stimolazione le cellule secernono proteine di matrice che vanno a modificare le proprietà del costrutto stesso) si potrebbe rischiare di rimanere sempre in fase di infusione provocando ad esempio l'eccessivo riempimento della camera in cui è alloggiato il tessuto/organo e quindi il danneggiamento del costrutto stimolato. In questa modalità perde significato l'indicatore del volume infuso/aspirato per ciclo (blocco D di Figura 2.16) in quanto non è possibile a priori sapere quanto volume dovrà essere infuso/aspirato per

raggiungere le soglie di pressione impostate e inoltre non è detto che serva lo stesso volume in ogni ciclo poiché la risposta dei tessuti biologici non è sempre lineare e, come accennato, non rimane costante nel tempo.

Anche in questo caso l'architettura che sta dietro a questa modalità di funzionamento del programma verrà illustrata nel capitolo 3.

2.5.3.2 Area monitoraggio stimolazione

In quest'area del pannello di controllo (riquadro viola di Figura 2.13) sono disposti i grafici che mostrano l'andamento in tempo reale della stimolazione: P(V), P(t), V(t) (Figura 2.17).

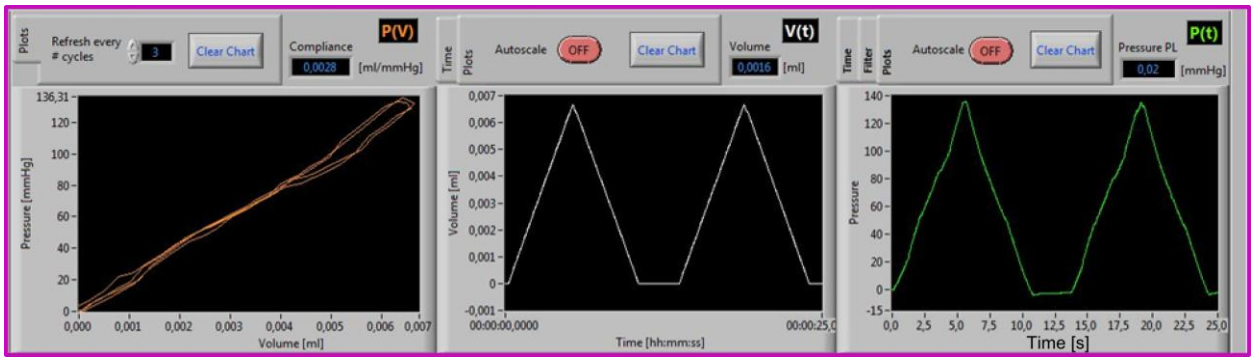


Figura 2.17 Area di monitoraggio della stimolazione. Da sinistra a destra: grafico P(V), grafico V(t), grafico P(t). Modalità controllo in volume automatica impostando un pattern di stimolazione (infusione – aspirazione – rest) durante una stimolazione di un patch di lattice. Sopra i pannelli grafici sono visibili i loro controlli.

Il grafico sulla destra (Figura 2.17) mostra il tracciato di pressione letto dal sensore di pressione nel tempo, visualizzando il segnale dei canali attivi (Pannello #2). Come introdotto nel paragrafo 2.5.2, alle finestre grafiche sono associati vari controlli (autoscale, filtraggio del segnale, finestra temporale visualizzata, refresh della finestra…).

Il grafico centrale di Figura 2.17 mostra invece l'andamento del volume infuso/aspirato dalla pompa nel tempo. Questo grafico è costruito tramite il segnale di tensione in uscita dalla pompa, il quale è proporzionale alla velocità di rotazione dei rulli e quindi alla portata effettiva fornita dalla pompa. Non è quindi un andamento teorico basato sul valore di portata imposto dall'utente ma è costruito tramite i valori di tensione effettivi acquisiti dalla pompa (convertiti poi dal SW in portata) e letti in tempo reale (paragrafo 2.2.1.1, pin 9 in Figura 2.4).

L'ultimo grafico (a sinistra in Figura 2.17), unisce i due precedenti. Difatti, rappresenta l'andamento della pressione in funzione del volume; da quindi un'informazione sulla compliance del tessuto stimolato.

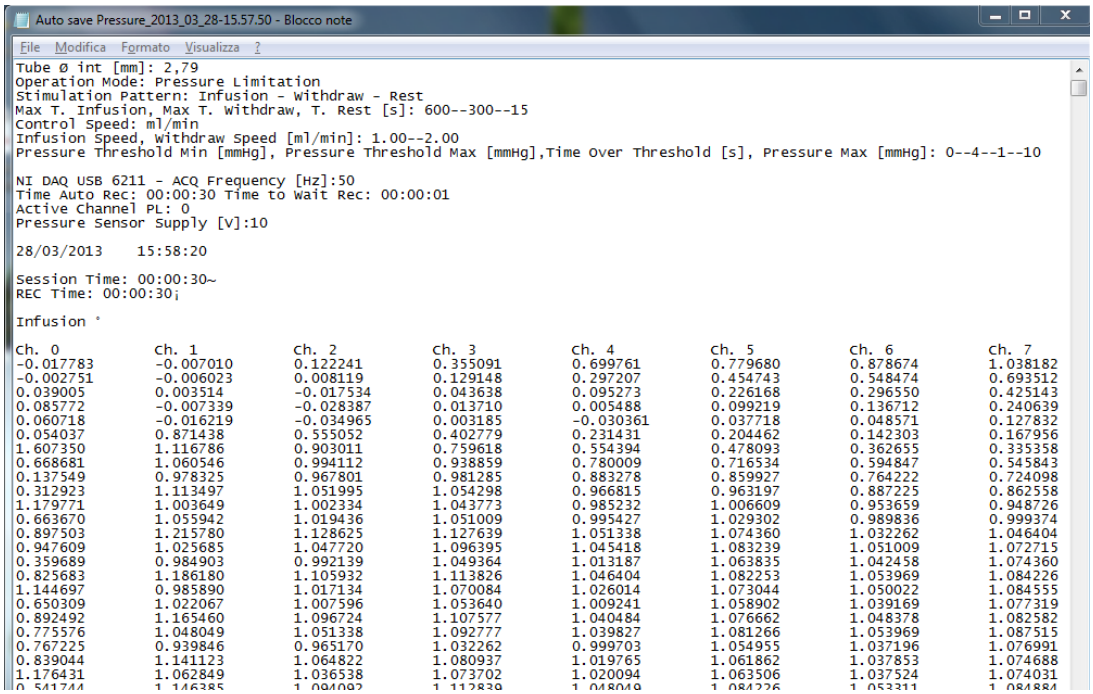
Tramite questi tre pannelli viene soddisfatta la specifica che consente all'utente di monitorare in tempo reale l'andamento della stimolazione, specifica di fondamentale importanza, come introdotto nel paragrafo 2.3.

2.5.3.3 Area accessoria

L'ultima area presente nel pannello di controllo è quella accessoria (riquadro giallo di Figura 2.13). Quest'area (Figura 2.18) può essere suddivisa in due blocchi.

Figura 2.18 Area accessoria: area registrazione a sinistra, area avvio/arresto programma e stimolazione a destra.

Una prima parte (a sinistra in Figura 2.18) è dedicata alla registrazione dei segnali di volume e pressione. Qui l'utente può scegliere tra una registrazione manuale e una automatica. Nella registrazione manuale l'inizio e la fine della registrazione sono decisi dall'utente tramite il comando *manual rec*. Nella modalità automatica l'utente è in grado di registrare pacchetti di dati della durata desiderata (*T. Auto Rec*) e di definire l'intervallo di tempo che intercorre tra una registrazione e la successiva (*T. to Wait*). Il sistema salva automaticamente blocchi di dati registrati in un file di testo (.txt) che il programma genera nella cartella dove è presente il VI (Figura 2.19).



Auto save Pressure_2013_03_28-15.57.50 - Blocco note

File Modifica Formato Visualizza ?

```
Tube Ø int [mm]: 2,79
Operation Mode: Pressure Limitation
Stimulation Pattern: Infusion - Withdraw - Rest
Max T. Infusion, Max T. Withdraw, T. Rest [s]: 600--300--15
Control Speed: ml/min
Infusion Speed, Withdraw Speed [ml/min]: 1.00--2.00
Pressure Threshold Min [mmHg], Pressure Threshold Max [mmHg],Time Over Threshold [s], Pressure Max [mmHg]: 0--4--1--10

NI DAQ USB 6211 - ACQ Frequency [Hz]:50
Time Auto Rec: 00:00:30 Time to Wait Rec: 00:00:01
Active Channel PL: 0
Pressure Sensor Supply [V]:10

28/03/2013    15:58:20

Session Time: 00:00:30~
REC Time: 00:00:30¡

Infusion °

Ch. 0          Ch. 1          Ch. 2          Ch. 3          Ch. 4          Ch. 5          Ch. 6          Ch. 7
-0.017783      -0.007010      0.122241       0.355091       0.699761       0.779680       0.878674       1.038182
-0.002751      -0.006023      0.008119       0.129148       0.297207       0.454743       0.548474       0.693512
0.039005       0.003514       -0.017534      0.043638       0.095273       0.226168       0.296550       0.425143
0.085772       -0.007339      -0.028387      0.013710       0.005488       0.099219       0.136712       0.240639
0.060718       -0.016219      -0.034965      0.003185       -0.030361      0.037718       0.048571       0.127832
0.054037       0.871438       0.555052       0.402779       0.231431       0.204462       0.142303       0.167956
1.607350       1.116786       0.903011       0.759618       0.554394       0.478093       0.362655       0.335358
0.668681       1.060546       0.994112       0.938859       0.780009       0.716534       0.594847       0.545843
0.137549       0.978325       0.967801       0.981285       0.883278       0.859927       0.764222       0.724098
0.312923       1.113497       1.051995       1.054298       0.966815       0.963197       0.887225       0.862558
1.179771       1.003649       1.002334       1.043773       0.985232       1.006609       0.953659       0.948726
0.663670       1.055942       1.019436       1.051009       0.995427       1.029302       0.989836       0.999374
0.897503       1.215780       1.128625       1.127639       1.051338       1.074360       1.032262       1.046404
0.947609       1.025685       1.047720       1.096395       1.045418       1.083239       1.051009       1.072715
0.359689       0.984903       0.992139       1.049364       1.013187       1.063835       1.042458       1.074360
0.825683       1.186180       1.105932       1.113826       1.046404       1.082253       1.053969       1.084226
1.144697       0.985890       1.017134       1.070084       1.026014       1.073044       1.050022       1.084555
0.650309       1.022067       1.007596       1.053640       1.009241       1.058902       1.039169       1.077319
0.892492       1.165460       1.096724       1.107577       1.040484       1.076662       1.048378       1.082582
0.775576       1.048049       1.051338       1.092777       1.039827       1.081266       1.053969       1.087515
0.767225       0.939846       0.965170       1.032262       0.999703       1.054955       1.037196       1.076991
0.839044       1.141123       1.064822       1.080937       1.019765       1.061862       1.037853       1.074688
1.176431       1.062849       1.036538       1.073702       1.020094       1.063506       1.037524       1.074031
0.541744       1.146385       1.094092       1.112839       1.048049       1.084226       1.053311       1.084884
```

Figura 2.19 Esempio di file generato tramite registrazione automatica. L'intestazione riporta i parametri della stimolazione impostata.

I dati sono salvati in un file .txt e sopra ogni blocco di dati registrati, il SW genera un'intestazione che riporta i parametri della stimolazione impostata e la fase attiva al momento della registrazione. In questo modo l'utente può sapere, anche in un secondo momento da che stimolazione derivino i dati che ha registrato. I file salvati sono etichettati tramite una radice comune (Auto save Pressure o Auto save Volume) e una parte variabile che riporta la data e l'ora in cui il file è stato generato. La modalità automatica di registrazione permette di campionare ad intervalli regolari la stimolazione, registrando pacchetti di dati, e consente quindi di ricostruire l'andamento della variabile registrata (pressione e/o volume) della prova senza dover registrare tutti i dati e rendendo così il post processing più agevole.

Vi è poi la possibilità di salvare la configurazione della stimolazione impostata (sottopompa, soglie di pressione, modalità di controllo, pattern, tempi e portate delle fasi) e di caricarla in un secondo momento senza dover reimpostare tutti i settaggi (*Save info, Load info*) così da poter ripetere la stessa stimolazione in un secondo momento.

Dopo che sono state effettuate tutte queste operazioni preliminari di configurazione, l'utente può finalmente lanciare la stimolazione tramite il pulsante *STOP/START* (area di destra in Figura 2.18). Quando la stimolazione è in corso, il pulsante è attivo con segnale luminoso verde. Terminata la prova, per uscire dal programma si utilizza il pulsante *Quit*. Vi è poi un comando di sicurezza (*ABORT*) che blocca gli attuatori e forza l'uscita dal programma. Questo elemento di

sicurezza è stato implementato in caso di eventi inattesi e dannosi che richiedono un immediato arresto del programma e degli attuatori.

2.5.4 Il pannello Post Processing

Terminata la fase di stimolazione, l'utente può decidere di analizzare i dati che ha eventualmente registrato, sia di pressione che di volume. Il pannello di post processing (Figura 2.20) offre la possibilità di effettuare un'analisi statistica sui dati registrati caricando il file .txt salvato durante la registrazione (paragrafo 2.5.3.3) ed elaborandone i dati.

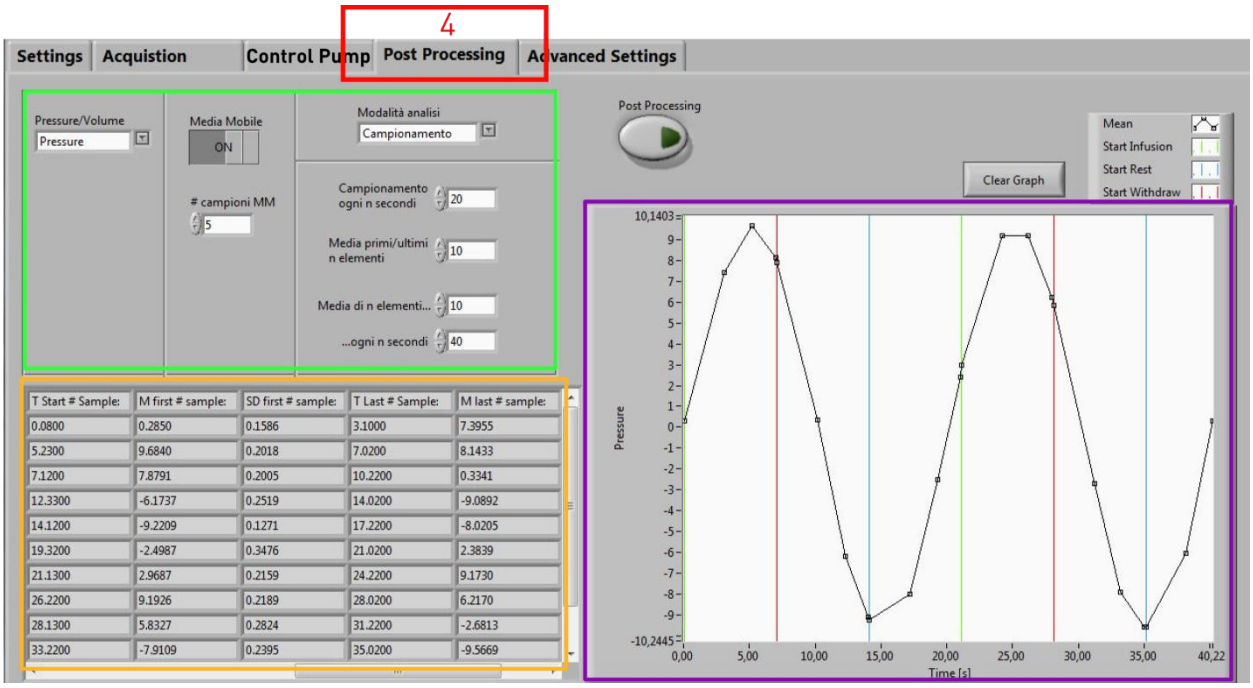


Figura 2.20 Pannello per il post processing. Riquadro verde: scelta della modalità di elaborazione dati; Riquadro arancione: tabella riassuntiva con i dati elaborati; Riquadro viola: grafico con i dati elaborati plottati e interpolati

La prima scelta che l'utente deve fare è se analizzare i dati relativi al segnale di pressione o di volume (a destra nel riquadro verde di Figura 2.20). Successivamente il software consente all'utente di eseguire (o meno) la media mobile dei dati, così da attenuare la componente di rumore indesiderata eventualmente sovrapposta al segnale di interesse. Inoltre, nel Pannello #3, l'utente ha deciso se registrare tutti i dati di ogni fase della stimolazione o alternare finestre temporali di registrazione a periodi di non registrazione, registrando così pacchetti di dati. Anche in base a questa scelta l'utente sceglierà come analizzare i dati tre le cinque modalità che il programma mette a disposizione (riquadro verde di Figura 2.20):

i. Primo e ultimo valore: questa modalità consente di estrarre il primo e l'ultimo valore della variabile (pressione o volume) di ogni pacchetto di dati registrato.

ii. Campionamento: consente di estrarre dai dati registrati un valore ogni *n* secondi di registrazione, dove *n* è un tempo impostabile dall'utente.
iii. Media: questa opzione permette di calcolare la media e la deviazione standard di ogni pacchetto di dati registrato.
iv. Media dei primi e ultimi *n* valori: in questa modalità il SW calcola la media e la deviazione standard dei primi e degli ultimi *n* valori di ogni pacchetto di dati registrato. Il parametro *n* è anche qui settabile dall'utente.
v. Media di *n* valori ogni *m* secondi: quest'ultima modalità calcola la media e la deviazione standard di pacchetti di *n* valori ogni *m* secondi di registrazione, dove *n* e *m* sono parametri che l'utente può impostare

In tutte le modalità di analisi dei dati, il programma genera un file di testo (.txt) riportante i dati estratti o le medie e le deviazioni standard calcolate, nonché la fase a cui questi dati fanno riferimento (infusione, aspirazione, rest).
Oltre a salvare un file con i dati elaborati, questo pannello permette di visualizzare i dati estratti in maniera immediata, sia tramite una tabella che riporta gli stessi dati salvati sul file (riquadro arancione di Figura 2.20) sia tramite una finestra grafica (riquadro viola di Figura 2.20). Nella finestra grafica vengono plottati in ordinata i valori estratti o le medie calcolate a seconda dell'analisi effettuata mentre in ascissa i valori temporali di riferimento per ciascun valore. Questi punti vengono poi interpolati dal SW e l'inizio di ogni nuova fase diversa dalla precedente è segnalato da una retta verticale colorata (verde per l'infusione, rossa per l'aspirazione e azzurra per la fase di rest).

2.5.5 Il pannello Advanced Settings

Questo pannello (Figura 2.21) è posto per ultimo in quanto non contiene impostazioni relative alla stimolazione ed è dedicato esclusivamente ad utenti esperti.

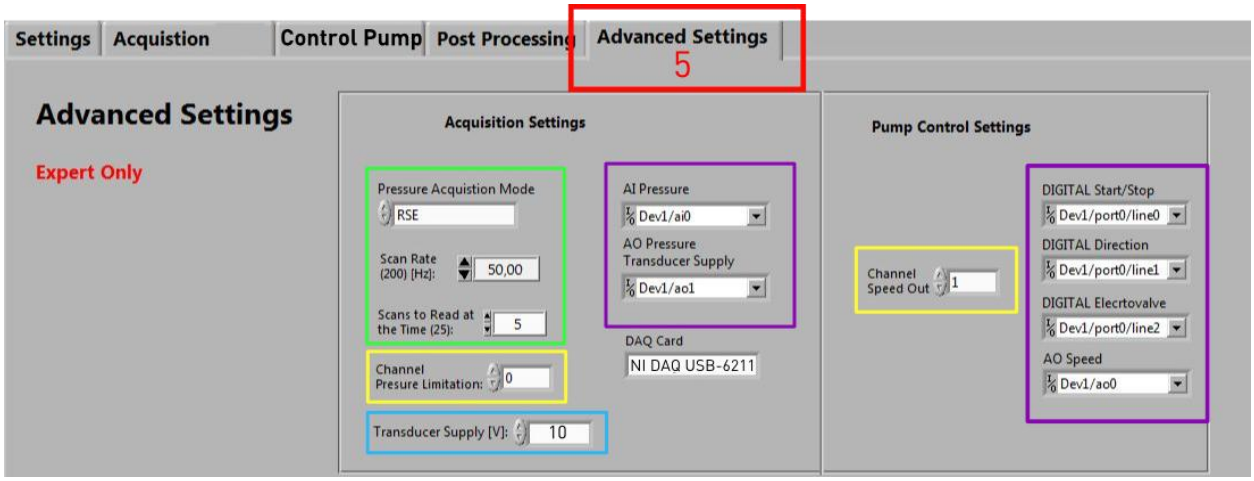


Figura 2.21 Pannello Advanced Settings: riquadro verde: parametri di acquisizione del segnale di pressione; riquadri viola: canali I/O della scheda NI DAQ; riquadri gialli: canali di input dedicati alla limitazione in pressione e alla acquisizione del segnale di tensione proporzionale alla portata impostata alla pompa; riquadro azzurro: tensione di alimentazione del sensore di pressione.

In questo pannello, infatti, è possibile impostare alcuni parametri che normalmente non occorre cambiare, e anzi, se impostati non correttamente, possono portare al non corretto funzionamento del programma. È quindi fondamentale che chi agisce su questi parametri abbia piena consapevolezza del loro significato e di come è costruito il software.

Nei riquadri viola di Figura 2.21 sono evidenziati i controlli per impostare i canali di I/O della scheda NI DAQ. Una volta che il cablaggio degli attuatori e trasduttori con la scheda NI DAQ è stato effettuato, questi parametri non vanno più modificati.

Un altro set di parametri che è possibile impostare è quello riguardante l'acquisizione dei segnale di input analogici (segnale di pressione e segnale di tensione in uscita dalla pompa) (*Acquisition Settings* in Figura 2.21). È possibile impostare la modalità di acquisizione a seconda del cablaggio realizzato (RSE o differenziale, paragrafo 2.2.2), la frequenza di acquisizione del segnale (f).

In questo pannello sono selezionabili i canali (riquadri gialli di Figura 2.21), tra gli otto canali di AI disponibili nel SW, tramite i quali viene letto il valore di pressione utilizzato come parametro di controllo nella stimolazione in limitazione di pressione (canale 0, *Channel Pressure Limitation* in Figura 2.21) e la tensione in uscita della pompa (proporzionale alla portata impostata) (canale 1, *Channel Speed Out* in Figura 2.21) attraverso cui viene ricavato il volume (erogato/aspirato) mostrato nel pannello *Control Pump* del SW (paragrafo 2.5.3.2).

Il riquadro azzurro di Figura 2.21 invece evidenzia il controllo che permette di impostare la tensione di alimentazione del sensore di pressione (10 V nel caso si impieghi il sensore 26PCA della Honeywell, Figura 2.21). Questo controllo va ad agire quindi su un canale di output analogico (AO 1) della scheda NI DAQ dedicato all'alimentazione del sensore.

In questo capitolo si è descritto il sistema di controllo realizzato dal punto di vista dell'HW e dell'interfaccia utente del SW. Nel capitolo 3 andremo a descrivere nel dettaglio l'architettura del SW e le logiche di programmazione su cui è basato.

3. Architettura e collaudo del software di controllo

3.1 Architettura del software

Nel capitolo precedente sono state presentate e descritte le componenti che costituiscono il sistema di controllo sviluppato e le funzionalità che il software (SW) di controllo mette a disposizione dell'utente. In questo capitolo saranno descritte nel dettaglio le specifiche soluzioni progettuali che hanno portato alla realizzazione delle varie funzionalità della parte SW sviluppata in ambiente LabVIEW® (National Instruments). Al fine di rispettare la specifica di modularità (paragrafo 2.3), il SW è stato progettato e realizzato secondo una scala gerarchica comprendente due diversi livelli: nel primo livello è presente il VI principale che consente di richiamare ed eseguire i vari SubVI che rappresentano il secondo livello (Figura 3.1).

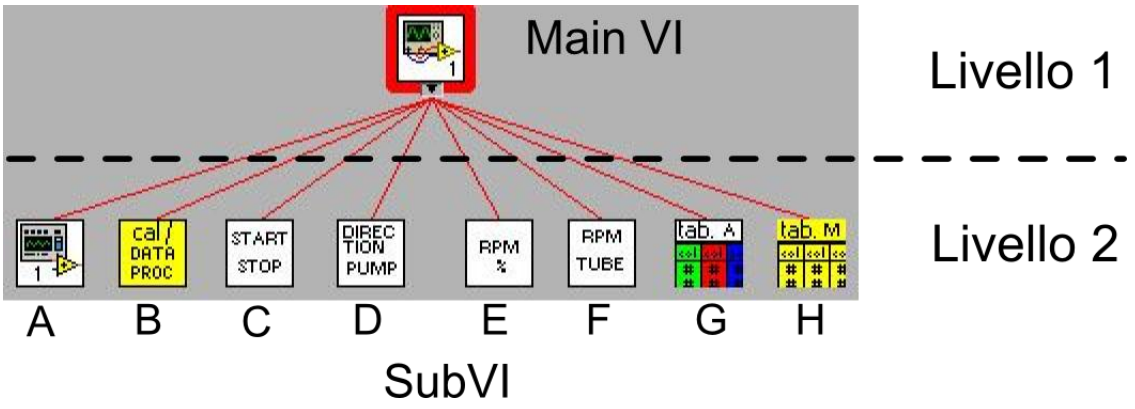


Figura 3.1 Struttura gerarchica del SW di controllo: il SW è suddiviso in 2 livelli, il primo livello comprende il Main VI che gestisce i vari SubVI appartenenti al secondo livello. In figura vengono schematizzati gli 8 SubVI utilizzati per l'invio e l'acquisizione dati tramite i canali di ingresso e uscita della scheda NI DAQ (A), il monitoraggio del segnale di pressione (B), l'invio del comando di avvio/arresto della pompa (C), l'invio del comando di inversione del verso di rotazione della pompa (infusione-aspirazione) (D), la regolazione della portata della pompa espressa in RPM% (E) o in ml/min (F), la registrazione dati in modalità automatica (G) o manuale (H) per le operazioni di postprocessing.

L'interfaccia utente, illustrata nel Paragrafo 2.5, è costruita nel Main VI (livello 1 in Figura 3.1), mentre i SubVI (livello 2 in Figura 3.1) vengono eseguiti in background solo quando sono

richiamati dal VI principale. L'utente quindi non dovrà mai interfacciarsi con i SubVI, poiché questi ultimi svolgeranno le loro operazioni attraverso una gestione diretta da parte del Main VI.

3.1.1 Main VI

In LabVIEW® è possibile tradurre i cicli condizionati (if-else, while, for…) tipici di altri linguaggi di programmazione (C, C++, ...) tramite appositi "blocchi", definiti *structure.* All'interno di tali *structure* lo sviluppatore del SW crea le connessioni logiche tra i vari elementi che determinano l'esecuzione delle operazioni da cui dipende il flusso di dati del programma. Si illustrano di seguito le tipologie di cicli impiegati nello sviluppo di questo SW:

- ciclo *while*: le operazioni in esso contenute vengono eseguite in maniera iterativa ed eventualmente temporizzata finché il flusso di dati, o un comando esterno da parte dell'utente, non determina una variazione del valore assunto dalla variabile di controllo del ciclo. La variabile di controllo è di tipo booleano ossia può assumere i valori *vero/falso*. È rappresentato da un rettangolo dagli angoli smussati (W in Figura 3.2);
- case *true/false*: la variabile di controllo del case è di tipo booleano. In base al valore corrente della variabile di controllo vengono eseguite una sola volta le operazioni contenute nella finestra del case corrispondente (*vero* o *falso*). Come per il ciclo *while,* è il flusso logico dei dati o un comando dell'utente, attraverso l'interfaccia utente del SW, a determinare il valore assunto dalla variabile di controllo. È rappresentato da un rettangolo bianco e nero dove la variabile di controllo è indicata da un rettangolo verde (T/F in Figura 3.2);
- case *multiplo*: la variabile di controllo del case può essere di tipo numerico (1, 2, 3..) o una stringa di caratteri (infusion, withdraw, rest..): in base al valore della variabile di controllo viene abilitata la corrispondente finestra del case e di conseguenza vengono eseguite le specifiche operazioni in essa contenute. È rappresentato da un rettangolo bianco e nero dove la variabile di controllo è indicata da un rettangolo azzurro (variabile numerica) o da un rettangolo rosa (variabile stringa) (MC in Figura 3.2).

Nel SW sviluppato nel presente progetto di tesi, il VI principale gestisce l'esecuzione delle operazioni contenute in 7 differenti cicli *while* come schematizzato in Figura 3.2:

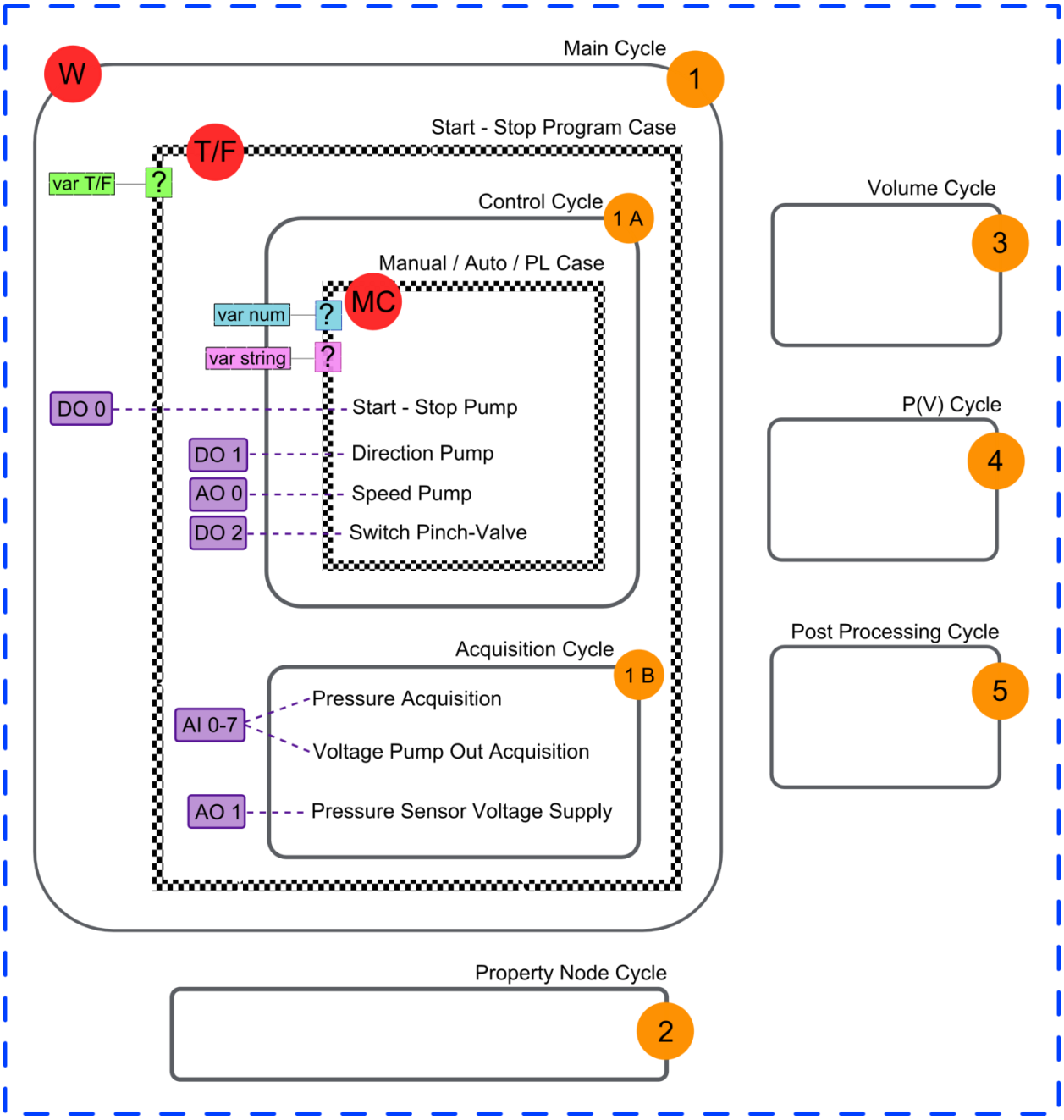


Figura 3.2 Schema della architettura dei cicli che compongono il SW di controllo: esso è composto da 7 cicli *while* (1-5 e 1A, 1B), un case *true/false* (TF), ed un case *multiplo* (MC) tra loro opportunamente interconnessi.

Nel dettaglio:

- il ciclo *while* Main (1 in Figura 3.2) contiene ed abilita/disabilita l'esecuzione del ciclo *while* di controllo degli attuatori (1A in Figura 3.2) e del ciclo *while* di acquisizione dati (1B in Figura 3.2);
- nel ciclo *while Property Node* (2 in Figura 3.2) sono definiti gli attributi e le proprietà dei controlli e degli indicatori dell'interfaccia utente descritta nel capitolo 2;

- due cicli *while* dedicati alla costruzione delle finestre di visualizzazione grafica, ovvero il grafico del valore del volume infuso/aspirato dalla pompa rispetto al tempo di avanzamento della stimolazione, costruito sulla base dei parametri impostati dall'utente (pattern di stimolazione, valori di portata, durata delle varie fasi del ciclo) (ciclo while 3 in Figura 3.2), il grafico del valore della pressione acquisita dal sensore ed il grafico della pressione rispetto al volume (ciclo while 4 in Figura 3.2), anche questi ultimi visualizzati in tempo reale rispetto al tempo di stimolazione;
- il ciclo *while* adibito alle operazioni di post processing (5 in Figura 3.2).

3.1.1.1 Ciclo Main

Il ciclo *Main* (1 in Figura 3.2) è il cuore del programma in quanto contiene le istruzioni necessarie per l'esecuzione di tutte le funzioni relative all'attuazione, al monitoraggio e al controllo degli attuatori e all'acquisizione dei segnali inviati dai sensori. Il ciclo *Main* gestisce quindi l'invio e la ricezione dei segnali verso/da tutti i canali di input/output (I/O) della scheda NI DAQ.

A sua volta è diviso in due sotto cicli, ovvero il *ciclo di controllo* ed il *ciclo di acquisizione* (1A e 1B in Figura 3.2). Il primo è dedicato alle operazioni di controllo e attuazione sia della pompa che dell'elettrovalvola. Il secondo è dedicato all'acquisizione del segnale di tensione dalla pompa (*Voltage Pump Out Acquisition* in Figura 3.2), parametro che consente di controllare il valore della portata della pompa, e all'acquisizione del segnale inviato dal sensore di pressione (*Pressure Acquisition* in Figura 3.2); nel ciclo di acquisizione si fa uso di un canale di output analogico (AO1 in Figura 3.2) utilizzato per fornire, tramite la scheda NI DAQ, l'alimentazione al sensore di pressione.

La principale differenza tra questi due sotto cicli consiste nella loro differente temporizzazione, definita come l'intervallo di tempo che intercorre tra esecuzioni successive del ciclo. Nel dettaglio, il ciclo di controllo viene eseguito ogni 20 ms (il razionale che sta alla base della scelta di questo valore sarà discussa nel paragrafo 3.3) mentre la temporizzazione del ciclo di acquisizione dipende dalla frequenza di acquisizione selezionata dall'utente nel pannello *Advanced Settings* dell'interfaccia utente (paragrafo 2.5.5).

3.1.1.2 Ciclo dei Property Node

Il ciclo *Property Node* (2 in Figura 3.2) consente di modificare in run-time, ovvero durante l'esecuzione del SW, gli attributi e le proprietà dei controlli e/o degli indicatori presenti nella finestra di interfaccia utente del SW. Tramite i *Property Node* è possibile effettuare ad esempio

modifiche di alcuni parametri relativi alle finestre di visualizzazione grafica, quali il codice colore delle diverse curve visualizzate (volume-tempo, pressione-tempo, pressione-volume) e le proprietà degli assi del grafico (ampiezza della finestra temporale, autoscale del segnale in ordinata, ecc..). Inoltre i *Property Node* gestiscono l'attivazione o la disattivazione di alcuni controlli ed indicatori, in base al valore associato al *Property Node* corrispondente: ad esempio, se l'utente ha sceltodi lavorare in modalità di controllo in volume in modalità manuale (paragrafo 2.5.3.1.1) i *Property Node* disabilitano tutti i controlli dell'interfaccia utente che appartengono alle altre modalità di controllo (controllo in volume ed limitazione in pressione in modalità automatica). Questo ciclo è stato posto in un ciclo parallelo rispetto al ciclo Main principale, in quanto le operazioni in esso contenute non necessitano di essere eseguite con la medesima temporizzazione delle operazioni eseguite nel ciclo Main: la sua differente temporizzazione fa quindi si che questo ciclo venga eseguito ogni 200 ms (la scelta di questo valore sarà discussa nel paragrafo 3.3).

3.1.1.3 Ciclo del grafico pattern di stimolazione

Il ciclo denominato *Volume Cycle* (3 in Figura 3.2) è riservato alla costruzione del grafico che rappresenta il pattern di stimolazione definito dall'utente. In particolare, il grafico mostra il volume infuso/aspirato dalla pompa in funzione della durata del singolo ciclo di stimolazione, ovvero la durata complessiva delle varie fasi della stimolazione (paragrafo 2.5.3.1.2). Il grafico del ciclo di stimolazione dipende dallo specifico pattern di stimolazione selezionato, dalla durata e dalle portate delle varie fasi assegnate dall'utente. In funzione di queste impostazioni, il grafico mostra all'utente il ciclo di stimolazione risultante. Anche questo ciclo è parallelo al ciclo Main principale, in quanto, come per il ciclo delle proprietà (*Property Node*), non richiede di essere eseguito ad intervalli di tempo molto brevi; come per il ciclo precedente viene eseguito ogni 200 ms.

3.1.1.4 Ciclo del grafico pressione-volume

Il ciclo dedicato alla costruzione del grafico che mostra l'andamento della pressione rispetto al volume (4 in Figura 3.2) utilizza, in tempo reale, il valore della pressione acquisito dal sensore (*Acquisition Cycle* in Figura 3.2) e del volume processato (infuso/aspirato) dalla pompa (*Control Cycle* in Figura 3.2) per costruire il grafico della pressione rispetto al volume. Come per i due cicli sopra descritti, è parallelo al ciclo Main principale ed eseguito ogni 200 ms.

3.1.1.5 Ciclo di Post Processing

Il ciclo di *Post Processing* (5 in Figura 3.2) è adibito alle funzioni di post-elaborazione da parte dell'utente dei dati registrati durante la stimolazione. Queste funzioni non sono quindi integrate nel ciclo Main ma poste in un ciclo parallelo, così da non dover allocare nel ciclo Main le risorse di calcolo richieste per l'analisi e la post elaborazione dei dati: in questo modo si evita di rallentare il ciclo principale del programma e si garantisce che venga effettivamente eseguito ogni 20ms. Il ciclo di *Post Processing* è stato temporizzato in modo tale da essere eseguito ogni 200 ms.

3.1.2 SubVI

Analogamente agli ambienti di programmazione testuali tradizionali, l'ambiente LabVIEW® permette di creare dei sottoprogrammi, detti SubVI, che, solo quando richiamati dal VI principale, svolgono specifici pacchetti di operazioni. I SubVI contengono quindi dei cicli che potrebbero essere definiti come cicli "silenti", ovvero attivati ed eseguiti solo quando effettivamente necessario durante l'esecuzione del programma. L'utilizzo dei SubVI permette di suddividere in diversi blocchi funzionali i diversi sottoprogrammi. Tale soluzione progettuale consente quindi di evitare di annidare diversi cicli uno dentro l'altro o di concatenare in serie il flusso di diversi dati che sono in realtà tra loro indipendenti fino a rendere estremamente complesso e dispendioso (dal punto di vista delle risorse richieste al PC) il flusso di dati gestito dal Main VI e quindi, in definitiva, in modo da non rallentare inutilmente la temporizzazione del Main VI. Inoltre, aspetto non trascurabile rispetto alle specifiche definite per il sistema di controllo, l'utilizzo dei SubVI rende più immediata la modifica di singole parti del SW qualora si renda necessario un aggiornamento in funzione di nuove richieste/specifiche/applicazioni che potrebbero emergere in futuro. Ad esempio sarà possibile aggiungere/eliminare/modificare un singolo SubVI senza dover rivedere l'architettura generale dell'intero SW.

In questo programma sono presenti otto SubVI (livello 2 di Figura 3.1) di seguito descritti:

- due SubVI (A e B in Figura 3.1) sono stati costruiti per svolgere specifiche operazioni all'interno del ciclo di acquisizione del segnale di pressione (1B in Figura 3.2), quali l'abilitazione dei canali di acquisizione della scheda NI DAQ (A di Figura 3.1) e la calibrazione del sensore di pressione (*Cal Data Proc*, B di Figura 3.1);
- quattro SubVI indicati con C, D, E e F in Figura 3.2 gestiscono invece operazioni relative al ciclo di controllo (1A in Figura 3.2). Attraverso questi SubVI è possibile gestire i segnali che il SW invia per il controllo della pompa. Nel dettaglio, il SubVI *Start Stop* (C di Figura 3.1) gestisce l'invio del segnale di avvio e arresto della pompa. Allo stesso

modo il SubVI *Direction Pump* (D di Figura 3.1) consente di modificare la direzione di moto dei rulli della pompa (orario o antiorario) e quindi la direzione del flusso del fluido all'interno del circuito idraulico del setup sperimentale. I SubVI E e F sono invece adibiti al controllo della velocità di rotazione dei rulli della pompa, ossia della portata che la pompa deve garantire, in funzione della scelta, da parte dell'utente, di impostare la portata in *RPM %* (E in Figura 3.1) o in termini di ml/min (*RPM Tube*, F in Figura 3.1). In quest'ultimo caso, è il SubVI F che utilizza l'opportuna retta di calibrazione della portata in funzione del diametro interno dello specifico sottopompa selezionato;

- due SubVI (G e H in Figura 3.1) "chiamati" dal Main VI solo durante le fasi di registrazione dei segnali di pressione e volume. Il SubVI G è dedicato alla modalità automatica di registrazione (paragrafo 2.5.3.3), mentre il sottoprogramma H consente di gestire le operazioni relative alla registrazione manuale dei dati di pressione e volume (paragrafo 2.5.3.3).

3.1.2.1 SubVI per il controllo della portata della pompa

I SubVI dedicati al controllo della portata della pompa sono due: i) il SubVI *RPM %* e ii) il SubVI *RPM Tube*. Il controllo della portata è eseguito attraverso l'architettura descritta qui di seguito (Figura 3.3) implementata tramite un case *multiplo* (paragrafo 3.1.1).

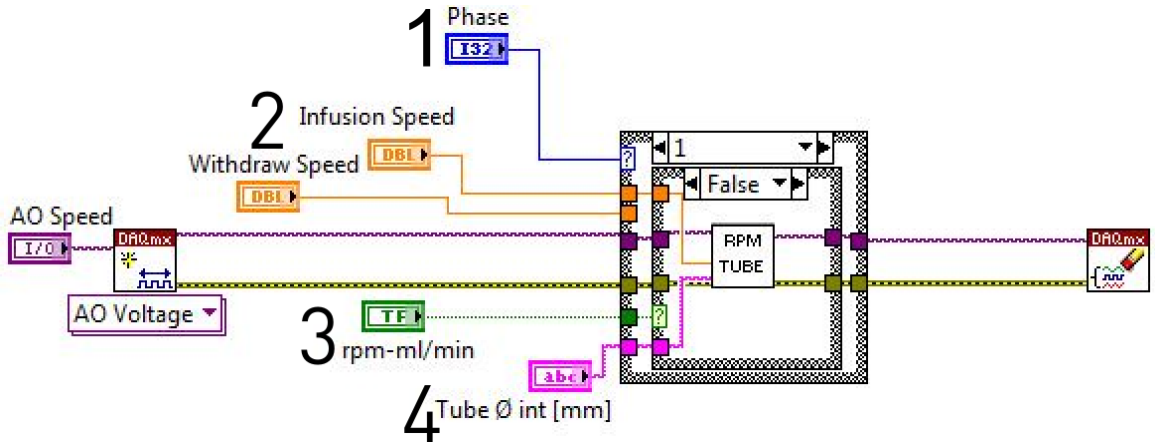


Figura 3.3 Architettura del SW dedicata al controllo della portata della pompa. Parametri di input: fase della stimolazione (1), portata di infusione e aspirazione (2), portata in RPM% o ml/min (3), diametro interno del sottopompa (4).

Il blocco di operazioni riceve diversi parametri di input che determinano poi l'effettivo valore di tensione proporzionale alla portata che il SW invierà alla pompa. Un primo case riceve l'informazione sulla fase di stimolazione (infusione o aspirazione, 1 in Figura 3.3) in cui si trova il programma; questa indicazione va ad abilitare la corrispondente finestra del case così che il SubVI riceva il valore della portata di infusione o di quella di aspirazione impostata dall'utente

(2 in Figura 3.3). Tramite un case interno di tipo *true/false* il SW traduce la scelta dell'utente di assegnare la portata in RPM% o ml/min (3 in Figura 3.3) attivando rispettivamente il SubVI *RPM %* e il SubVI *RPM Tube* (in Figura 3.3 viene mostrato il caso di *RPM Tube*). Se è attiva la modalità "ml/min", il SubVI *RPM Tube* riceve inoltre l'indicazione del diametro interno del sottopompa utilizzato (4 in Figura 3.3), informazione necessaria per applicare l'opportuna conversione per il calcolo del volume da erogare. L'elaborazione di questi parametri di input si traducono in un valore di tensione, proporzionale alla portata richiesta alla pompa, che il SW invia al motore della pompa.

3.2 Architettura delle modalità di controllo della stimolazione

In questo paragrafo saranno illustrate le tre modalità di controllo della stimolazione che il SW mette a disposizione dell'utente, dal punto di vista della logica progettuale su cui è basata ciascuna modalità. Inoltre verranno presentati alcuni problemi riscontrati durante la fase di sviluppo del SW, i test di collaudo effettuati per giungere all'identificazione degli errori che causano i problemi riscontrati e le successive modifiche apportate all'architettura del SW che hanno consentito di risolverli.

3.2.1 Controllo in volume: modalità manuale

Come illustrato nel capitolo precedente questa è la modalità più semplice che il sistema mette a disposizione ed è basata sull'esecuzione dei Sub VI *Start Stop* (C in Figura 3.1), e *Direction Pump* (D in Figura 3.1). Il SubVI *Start Stop* è attivato attraverso una variabile booleana il cui valore è definito dal comando di Start-Stop del pannello di controllo della pompa nell'interfaccia utente descritto nel paragrafo 2.5.3.3. Quando l'utente attiva il comando *Start*, la variabile booleana assume il valore *vero* e viene attivata la rotazione dei rulli della pompa. Quando viene poi attivato il comando *Stop*, la variabile booleana passa al valore *falso* arrestando così la rotazione dei rulli.

Il controllo sulla direzione di rotazione dei rulli della pompa è gestito attraverso un'altra variabile booleana che attiva l'esecuzione del SubVI *Direction Pump*: il valore *vero* si traduce nella rotazione oraria dei rulli (infusione) mentre il valore *falso* nella rotazione in senso antiorario (aspirazione). E' l'utente tramite comando su interfaccia grafica a determinare il valore assunto dalla variabile booleana, agendo sul comando *Manual Stimulation: Infusion-Withdraw* paragrafo 2.5.3.1.1.

3.2.2 Controllo in volume: modalità automatica

Questa modalità consente all'utente di selezionare uno dei pattern di stimolazione tra quelli disponibili, ovvero la sequenza delle tre fasi di infusione, aspirazione e rest, i valori delle portate e delle durate di ciascuna fase. Il pattern così definito verrà poi eseguito in maniera ciclica ed automatica fino al ricevimento di un comando di arresto da parte dell'utente. L'architettura costruita per implementare questa logica è mostrata in Figura 3.4 dove vengono evidenziate le variabili di input/output ed il blocco di operazioni che vengono eseguite dal SW quando è attiva questa modalità. Anche in questo caso si è utilizzato un case *multiplo* in cui la variabile di controllo è del tipo stringa di caratteri, dove ogni stringa richiama una delle tre fasi del pattern di stimolazione. In base al pattern di stimolazione selezionato dall'utente (1 in Figura 3.4) il SW abilita la finestra del case multiplo corrispondente al pattern scelto: in Figura 3.4 viene mostrata, a titolo di esempio, la finestra corrispondente al pattern *Infusion-Withdraw-Rest*.

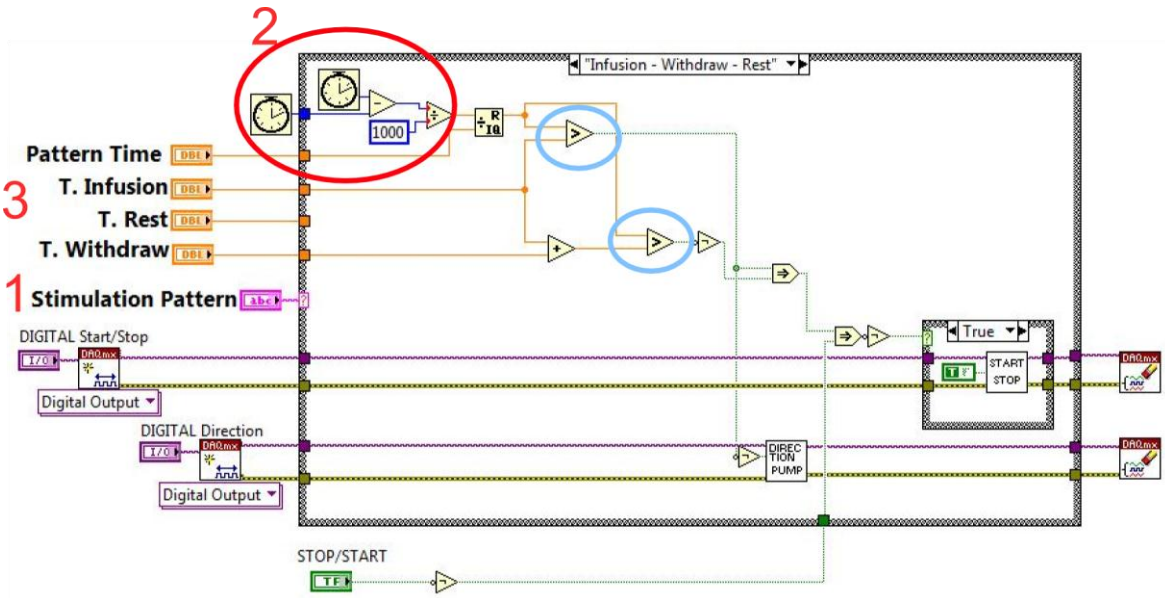


Figura 3.4 Architettura della funzione controllo in volume in modalità automatica: vengono evidenziati: il pattern di stimolazione impostato dall'utente (1), il contatore utilizzato per il controllo della durata delle fasi (2), i valori della durata delle fasi impostati (3), le operazioni svolte per la determinazione del passaggio da una fase della stimolazione alla fase successiva (riquadri azzurri).

Il passaggio da una fase ad un'altra è gestito tramite un contatore (2 in Figura 3.4) il cui valore viene confrontato (riquadri azzurri di Figura 3.4) con il tempo di durata impostato dall'utente per ciascuna fase del pattern (3 in Figura 3.4). Quando il valore del contatore è maggiore della durata impostata per la specifica fase in cui ci si trova in quell'istante, il SW invia un segnale al SubVI *Direction Pump* (D in Figura 3.1) che determina il passaggio alla fase successiva nel caso di passaggio tra Infusion-Withdraw (e viceversa) invertendo la direzione di rotazione dei rulli o al

SubVI *Start Stop* (C in Figura 3.1) che consente di arrestare la pompa, nel caso in cui la fase successiva sia quella di *Rest* (pompa ferma). Questo confronto viene eseguito in maniera iterativa per tutta la durata della stimolazione, con una temporizzazione pari a 20ms. In questa modalità, quindi, il passaggio da una fase ad un'altra del pattern è governato dalla variabile tempo ovvero dalla durata di ciascuna fase.

Inoltre, impostando la durata e la portata delle singole fasi, l'utente definisce il valore del volume che verrà infuso e aspirato ad ogni ciclo.

Il passo successivo è stato quindi quello di creare un blocco che consentisse di monitorare il volume effettivamente erogato dalla pompa nel tempo e di inserire una finestra grafica nell'interfaccia utente che ne consentisse la visualizzazione in tempo reale. L'architettura di questo blocco è mostrata in Figura 3.5.

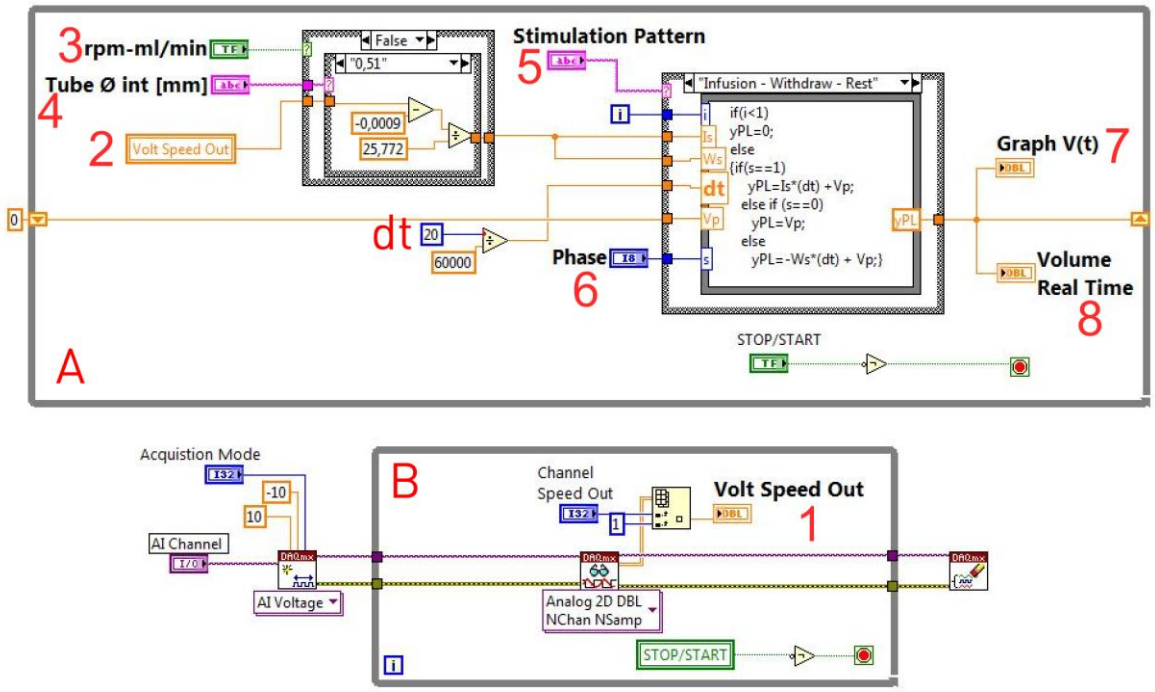


Figura 3.5 Architettura del ciclo dedicato al monitoraggio del volume erogato dalla pompa. Si distinguono: ciclo di controllo (A), ciclo di acquisizione (B), tensione erogata dal motore della pompa ed acquisita dal SW (1) memorizzata in una variabile locale (2), portata espressa in RPM% o ml/min (3), diametro interno del sottopompa (4), pattern di stimolazione (5), fase della stimolazione corrente (6), finestra grafica del volume nel tempo (7), indicatore numerico del volume in tempo reale (8).

Per consentire il monitoraggio del valore di volume il SW esegue le seguenti operazioni:

1. attraverso la scheda NI DAQ, il SW acquisisce il valore di tensione (*Volt Speed Out*, 1 in Figura 3.5B) erogata dal motore della pompa per garantire la portata richiesta dall'utente. Tale valore, acquisito nel ciclo di acquisizione (Figura 3.5B) viene passato tramite una variabile locale (2 in Figura 3.5A) al ciclo parallelo di controllo (Figura 3.5A);

2. nel ciclo parallelo di controllo, il valore di tensione (*Volt Speed Out*) viene convertito in un valore di portata. A seconda che l'utente imposti la portata in RPM% o ml/min (3 in Figura 3.5A) il SW attiva la finestra del case vero/falso corrispondente per abilitare la procedura di calibrazione descritta nel paragrafo 3.4. Se, come in Figura 3.5A, è attiva la modalità ml/min, la variabile che definisce il diametro interno del sottopompa (4 in Figura 3.5A) agisce su un case multiplo per abilitare la corretta conversione da volt a ml/min per il sottopompa impostato;
3. il valore della portata viene quindi integrato nel tempo in funzione del pattern di stimolazione scelto (5 in Figura 3.5A) e della fase di stimolazione attiva in quel momento (6 in Figura 3.5A). In particolare, l'operazione di integrazione numerica avviene per le fasi di infusione e aspirazione; mentre per la fase di rest il volume visualizzato durante tutta la fase è pari all'ultimo valore del volume calcolato nella fase precedente; in rest, il calcolo del volume non viene fatto in base all'integrale della portata in quanto la tensione del motore, anche se la pompa è ferma, non è nulla (la pompa è accesa) e ciò porterebbe erroneamente al calcolo di un volume non nullo.
4. si ottiene così il valore del volume che viene poi inviato alla finestra grafica volume-tempo (7 in Figura 3.5A) e a un indicatore che mostra all'utente il valore numerico del volume infuso/aspirato in tempo reale (8 in Figura 3.5A).

L'operazione di integrazione numerica è stata effettuata come sommatoria dei valori di portata istantanea (Q_i) per l'intervallo temporale di integrazione (Δt) come mostrato nell'equazione 1.

$$V = \sum_i Q_i \, \Delta t \tag{1}$$

Il valore di Δt utilizzato dal SW (*dt* in Figura 3.5) nel calcolo dell'integrale della portata è pari al valore della temporizzazione del ciclo principale: questo vuol dire che il volume viene calcolato e aggiornato al valore corrente nella finestra volume-tempo, ogni 20ms.

Al termine della fase di realizzazione dell'architettura della modalità automatica del controllo in volume si è proceduto al collaudo della funzionalità della modalità appena descritta. In particolare, le prove sono state effettuate al fine di verificare che il SW garantisse che il volume infuso/aspirato dalla pompa fosse effettivamente pari al valore settato dall'utente e che ci fosse la ripetibilità tra il volume infuso/aspirato tra un ciclo e il successivo.

3.2.2.1 Test di collaudo del volume erogato nella modalità automatica di controllo in volume

Il collaudo è stato effettuato attraverso alcune prove preliminari lanciando l'esecuzione del SW, collegato alla pompa, e registrando i dati visualizzati nella finestra grafica volume-tempo. In questa prova non è stato impiegato alcun circuito idraulico in quanto l'obiettivo della prova è valutare il volume infuso/aspirato in termini del calcolo del volume da parte del SW sulla base del segnale di tensione acquisito dalla pompa. Il set up sperimentale è quindi costituito dalla pompa interfacciata, tramite la scheda NI DAQ, con il SW di controllo.

Sono stati valutati due diversi pattern di stimolazione: A) Infusion-Withdraw-Rest (IWR) e B) Infusion-Rest-Withdraw (IRW). In entrambi i casi si è costruito un ciclo simmetrico ovvero sono stati impostati portata e durata di infusione pari alla portata e alla durata di aspirazione, così da ottenere un volume infuso complessivo pari a zero al termine di ciascun ciclo. Il tracciato dell'andamento del volume nel tempo registrato durante i test è riportato in Figura 3.6.

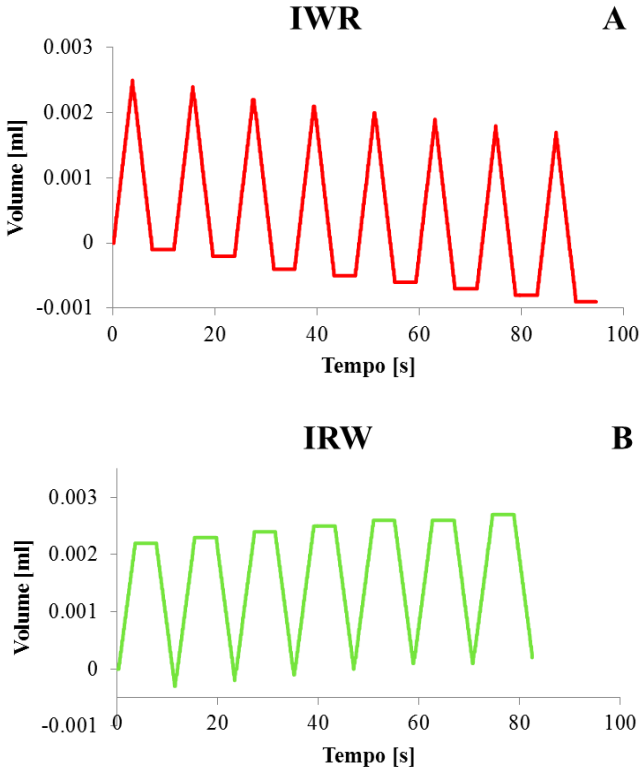


Figura 3.6 Tracciato del volume infuso/aspirato dalla pompa nel tempo, registrato per il pattern IWR (A) e IRW (B).

Si può osservare come in nessuno dei due test effettuati il volume torni al valore nullo che ci si attendeva al termine di ciascun ciclo: nel primo caso (IWR) si è osservata una deriva decrescente del volume verso valori negativi, mentre nel secondo caso (IRW) una deriva crescente verso

valori positivi. Questo significa che ad ogni ciclo successivo il SW forza l'aspirazione/l'infusione di un volume maggiore di quello infuso/aspirato nella fase precedente e non garantisce quindi che il volume erogato dalla pompa sia pari a quello impostato dall'utente.

Si è quindi indagato il motivo di questo fenomeno acquisendo ed analizzando nel dettaglio i valori di tensione in uscita dalla pompa (*Volt Speed Out*, Figura 3.5). Dall'analisi dei dati si è potuto verificare prima di tutto la presenza di un ritardo tra l'istante in cui il SW invia il comando di cambio fase alla pompa e la reale risposta della pompa nell'attuare il cambio di fase. Tale ritardo è stato stimato essere pari a circa 200 ms (valore medio su 10 cicli di ciascun pattern verificato).

Si è osservato che tale ritardo è conseguenza del fatto che durante il passaggio tra una fase e la successiva (es. I-W), il valore di *Volt Speed Out* si porta inizialmente a zero (0 V) per poi riportarsi al nuovo valore corrispondente al valore della portata impostata per la fase successiva (Figura 3.7).

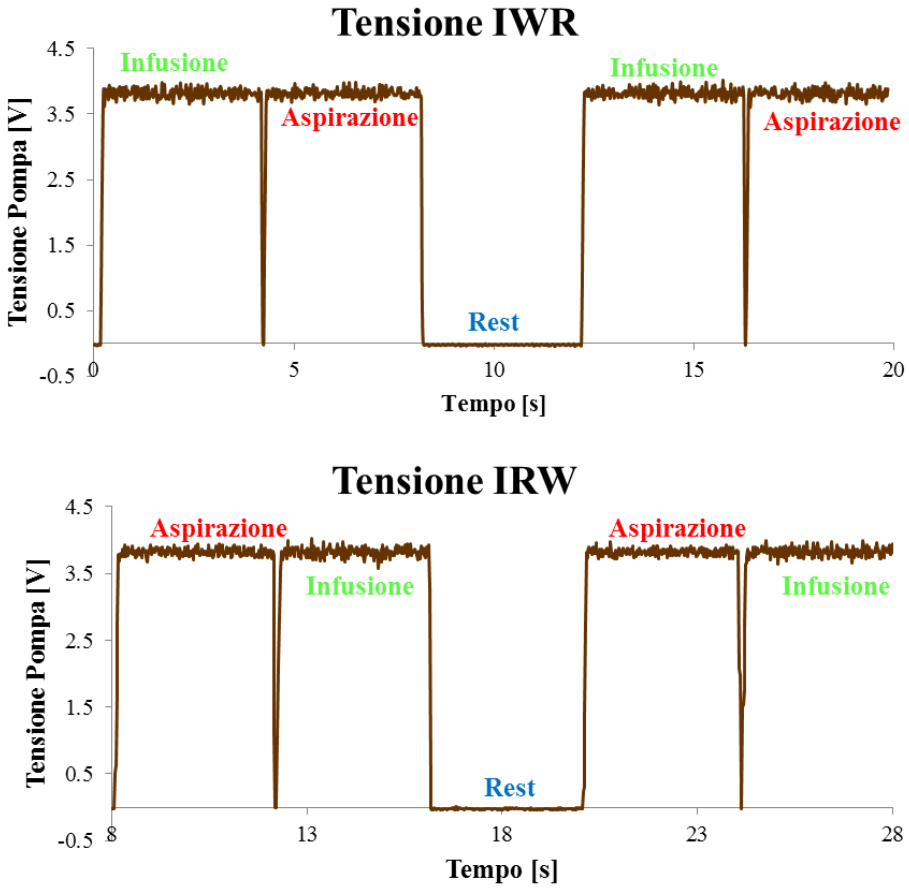


Figura 3.7 Comportamento della tensione *Volt Speed Out* erogata della pompa durante il cambio fase per diversi pattern di stimolazione (IWR e IRW). Si noti come, durante il cambio di fase, la tensione si porti al valore 0 V prima di riassestarsi al valore equivalente alla portata impostata per la fase successiva.

Tale comportamento rappresenta un limite fisico della pompa la quale, nel momento in cui deve invertire il verso di rotazione dei rulli, deve necessariamente in un primo momento fermare i rulli (*Volt Speed Out* pari a 0 V) e successivamente far ripartire la loro rotazione. Apparentemente però, questo fenomeno non è in grado di spiegare il motivo di derive negative o positive registrate durante le prove. In realtà dall'analisi dei dati, si è visto come questo effetto comporti un errore cumulativo nel calcolo del volume, che come visto nel paragrafo precedente è calcolato sulla base dell'integrale nel tempo del valore di *Volt Speed Out* (convertito in termini di portata). In particolare, si è osservato come l'errore nel calcolo dell'integrale sia differente nel passaggio dalla fase di rest alla fase di infusione e/o aspirazione rispetto al passaggio dalla fase di infusione a quella di aspirazione (e viceversa). Infatti, durante il passaggio di fase, a causa del fatto che la pompa passa prima ad un valore di 0 V per poi riportarsi alla tensione corrispondente alla portata richiesta (Figura 3.7), entrano nel calcolo dell'integrale della fase corrente un certo numero di valori di tensione appartenenti in realtà alla fase precedente (Tabella 3.1). Nel caso la fase precedente ad una fase di infusione/aspirazione sia una fase di rest, si è osservato come l'errore introdotto sia più significativo. Infatti, i valori di tensione associati alla fase di rest hanno un valore prossimo allo zero; ciò comporta che nel calcolo dell'integrale nella fase successiva (infusione/aspirazione), vengano considerati non solo i valori prossimi allo 0, dovuti al cambio di fase, ma anche i valori della fase precedente di rest, sempre prossimi allo 0. Questo spiega come l'errore nel calcolo dell'integrale sia maggiore nel passaggio da una fase di rest ad un'altra rispetto al passaggio, ad esempio dalla fase di infusione a quella di aspirazione (e viceversa). In questo ultimo caso, infatti, pur essendo il ritardo sempre della stessa durata, i valori della fase precedente errati che entrano nel calcolo dell'integrale della fase corrente, non sono prossimi allo 0 (a meno di portate nulle imposte) e quindi provocano un errore inferiore (Tabella 3.1).

La Tabella 3.1 mostra il numero e il valore numerico (riquadri gialli) dei valori di tensione che entrano erroneamente nel calcolo dell'integrale della fase successiva a causa dei ritardi introdotti dalla pompa. Sono mostrati i passaggi di fase da infusione a aspirazione e da rest a infusione per il pattern di stimolazione IWR (colonna 1 e 3 di Tabella 3.1), mentre per l'altro pattern testato, IRW, sono mostrati i dati nel passaggio di fase da aspirazione a infusione e da rest a aspirazione (colonna 2 e 4 di Tabella 3.1).

IWR	Tensione registrata [V]	IRW	Tensione registrata [V]	IWR	Tensione registrata [V]	IRW	Tensione registrata [V]
	3.8620		3.7844		-0.0057		-0.0060
	3.8669		3.7896		-0.0169		-0.0300
	3.8235		3.7535		-0.0350		-0.0067
	3.8291		3.7387		-0.0320		-0.0337
	3.7840		3.9034		-0.0248		-0.0110
	3.8067		3.8274		-0.0215		-0.0264
SW fine I	3.8133	SW fine W	3.7732	SW fine R	-0.0165	SW fine R	-0.0235
SW inizio W	3.7939	SW inizio I	3.8742	SW inizio I	-0.0057	SW inizio W	-0.0169
	3.8360		3.9064		-0.0452		-0.0235
	3.8113		3.8080		-0.0323		-0.0067
	3.7706		3.7640		-0.0304		-0.0337
	3.8080		3.8462		-0.0221		-0.0350
	3.7525		3.5594		-0.0189		-0.0165
	3.8281		0.6087		-0.0146		-0.0389
	1.5526	P fine W	-0.0083		-0.0142		-0.0172
	0.0410	P inizio I	0.1407		-0.0320		-0.0169
P fine I	-0.0172		0.1268	P fine R	-0.0389		-0.0136
P inizio W	1.3608		1.1602	P inizio I	0.6975	P fine R	-0.0215
	2.4267		2.4205		2.0765	P inizio W	0.5077
	3.5545		3.3180		3.1694		0.6307
	3.8577		3.8594		3.8301		1.7318
	3.7324		3.8304		3.8439		2.7957
	3.8646		3.8084		3.7952		3.7827
	3.8370		3.8025		3.8649		3.6949

Tabella 3.1 Analisi della tensione in uscita dalla pompa registrata per due diversi pattern di stimolazione, IWR e IRW. Sono evidenziati i valori della tensione al momento dell'invio da parte del SW del segnale di cambio fase (SW inizio e SW fine) e al momento dell'effettivo cambio fase effettuato dalla pompa (P inizio e P fine). Si osserva come il SW considera erroneamente alcuni valori di tensione nel calcolo del volume. Il numero di tali dati (riquadri gialli) è differente in funzione delle specifica sequenza delle fasi.

E' importante sottolineare come la presenza nei grafici di Figura 3.6 di valori di volume affetti da deriva positiva/negativa non è solo un effetto di errata elaborazione grafica da parte del SW, ma si traduce in un effettivo errato volume infuso/aspirato. Pertanto, si è reso necessario rivedere l'architettura del SW relativa al calcolo del volume processato dalla pompa.

3.2.2.2 Modifica dell'architettura della modalità automatica in controllo di volume

Per ovviare al problema relativo alla deriva dei volumi descritto nel paragrafo precedente si è quindi deciso di modificare l'architettura del ciclo di controllo della modalità automatica in controllo di volume. Il controllo nel tempo della durata delle varie fasi del ciclo ha, infatti, mostrato di non garantire lo stesso volume infuso/aspirato tra un ciclo e il successivo a causa dei ritardi della pompa nel mettere in atto le indicazioni ricevute dal SW e dell'errore introdotto nel

calcolo dell'integrale. Si è quindi deciso di modificare la variabile di controllo della durata delle fasi del ciclo passando da un controllo nel tempo ad un controllo del volume effettivamente erogato dalla pompa. Il ciclo modificato a valle dei primi test di collaudo è mostrato in Figura 3.8.

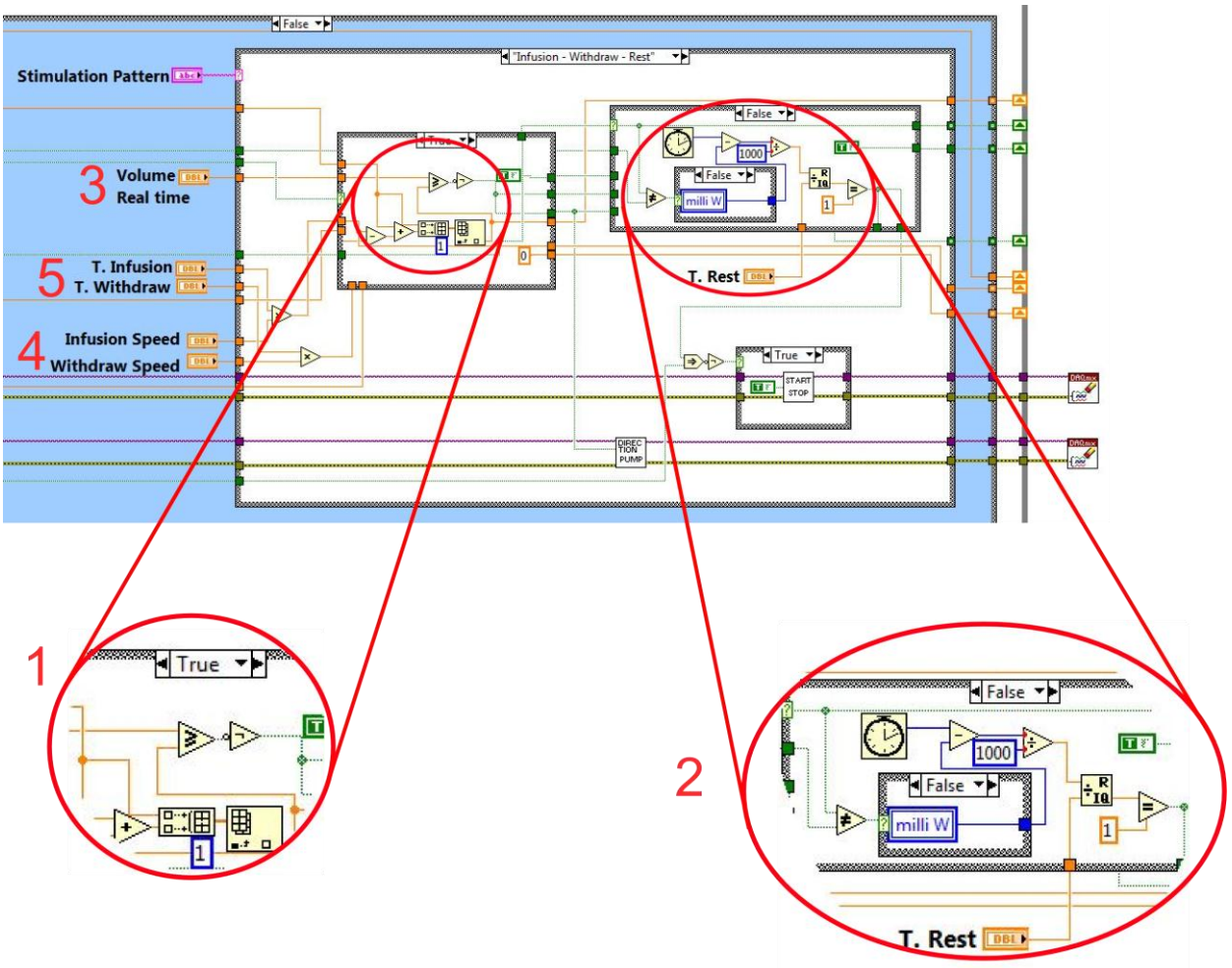


Figura 3.8 Blocco di programmazione del ciclo in modalità automatica con controllo in volume modificato: (1) il passaggio tra una fase e la successiva del pattern è basata sul controllo del volume infuso/aspirato dalla pompa nel passaggio tra infusione e aspirazione (e viceversa); (2) la durata della fase di rest è invece ancora controllata attraverso la variabile temporale relativa alla durata del rest. Si distinguono anche: il volume calcolato in tempo reale (3), le portate imposte dall'utente (4) e le durate delle fasi di infusione e aspirazione impostate dall'utente (5).

In questa nuova configurazione si è deciso comunque di mantenere il tempo come variabile di controllo della fase di rest: in questo modo (2 in Figura 3.8), quando la stimolazione è nella fase di rest, il SW invia il segnale di passaggio alla fase successiva di infusione/aspirazione quando il contatore raggiunge il valore associato alla durata del rest impostata dall'utente. Il passaggio dalla fase di infusione/aspirazione ad un'altra fase (infusione/aspirazione/rest) è invece gestita tramite il confronto (1 in Figura 3.8) tra il volume che la pompa sta erogando (3 in Figura 3.8) e il volume che l'utente ha impostato come target per ciascuna delle fasi. Il volume erogato è

calcolato in tempo reale tramite conversione a partire dalla tensione (*Volt Speed Out*) acquisita dalla pompa come descritto nel paragrafo 3.2.2. Il valore di target con cui il volume in tempo reale si deve confrontare, è invece dato dalla portata della fase di infusione e/o di aspirazione (4 in Figura 3.8) moltiplicato per le rispettive durate (5 in Figura 3.8) impostate dall'utente. In questa nuova configurazione il SW quindi mantiene l'esecuzione della fase di infusione/aspirazione indipendentemente dalla durata della fase ma fintantoché il volume processato non è effettivamente pari a quello desiderato e imposato dall'utente (segnale ricevuto dalla pompa). Se durante la stimolazione l'utente modifica il valore della portata, il volume target si aggiorna in tempo reale: in questo modo viene mantenuta la possibilità che l'utente possa variare le condizioni della stimolazione a prova in corso.

Si sono condotte quindi delle nuove prove di collaudo per verificare l'efficacia del funzionamento di questa nuova architettura. Il set up sperimentale realizzato è il medesimo di quello illustrato nel paragrafo 3.2.2.1. È stato quindi valutato l'andamento del segnale di tensione della pompa, proporzionale al volume, in varie condizioni di stimolazione. Il pattern di stimolazione impostato prevede una prima fase di infusione, seguita da una di aspirazione e per ultima una fase di rest. Le tre configurazioni testate variano per i valori delle portate impostate e per la durata delle varie fasi:

i. Portata: 40– 80 μl/min (Infusione - Aspirazione)
   Durata: 10 – 5 minuti (Infusione - Aspirazione) - 10 secondi (Rest)
ii. Portata: 0.6 – 1.2 ml/min (Infusione - Aspirazione)
   Durata: 10 – 5 minuti (Infusione - Aspirazione) – 10 secondi (Rest)
iii. Portata: 0.6 – 1.2 ml/min (Infusione - Aspirazione)
   Tempi: 20 – 10 secondi (Infusione – Aspirazione) – 10 secondi (Rest)

In tal modo si è collaudato il SW nel momento in cui esso debba gestire durate delle fasi lente (nell'ordine dei minuti) o veloci (nell'ordine dei secondi) associate a portate molto basse (μl/min) o più alte (ml/min).

La Figura 3.9 mostra il tracciato del volume nel tempo per le tre configurazioni verificate.

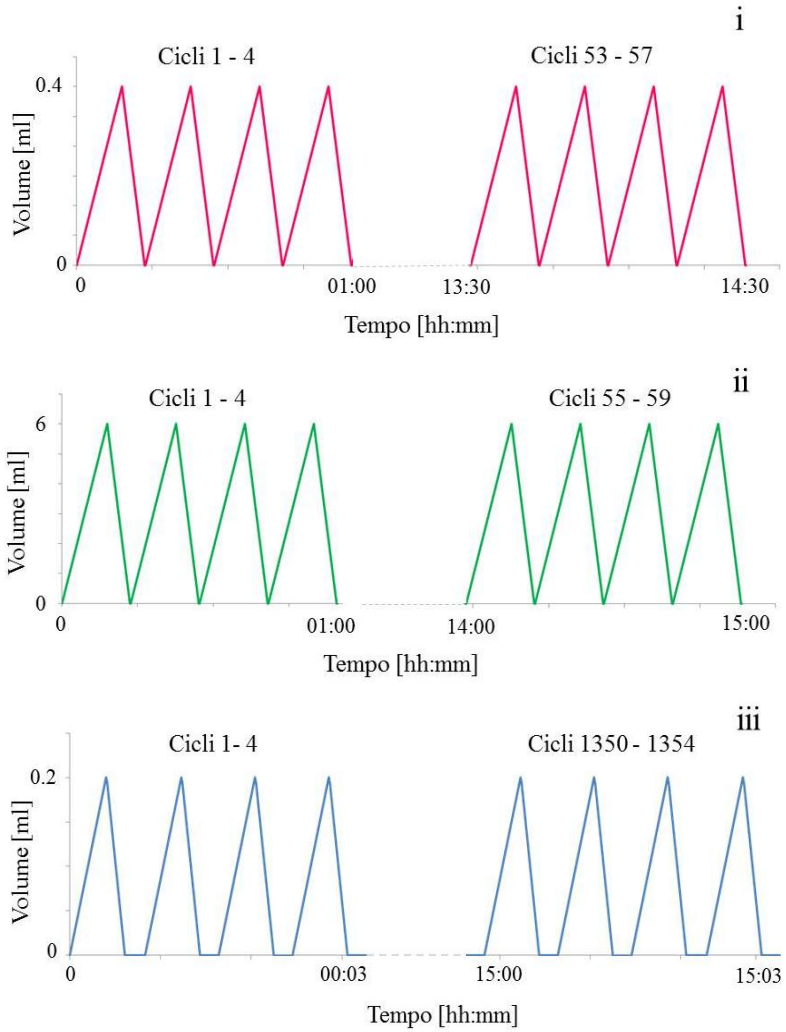


Figura 3.9 Tracciato del volume nel tempo per le configurazioni i, ii, iii imposte per verificare la capacità del SW di gestire la riproduzione di pattern di stimolazione corretti.

Si può osservare come il tracciato di volume non presenti derive e rimanga per tutta la durata della stimolazione tra i due valori di volume impostati dall'utente.

3.2.3 Stimolazione in limitazione di pressione: modalità automatica

La terza modalità che il software mette a disposizione dell'utente è la stimolazione in controllo di volume limitata in pressione, indicata nel proseguo della Tesi come *modalità di limitazione in pressione*. Dal punto di vista dell'architettura del SW, questa modalità è simile alla modalità automatica del controllo in volume tranne per il fatto che la variabile di controllo che determina il passaggio da una fase alla successiva (nel caso di infusione/aspirazione) non è il volume erogato dalla pompa ma la pressione che il fluido processato dalla pompa esercita sul campione stimolato. In questa modalità dunque l'utente imposta due soglie di pressione (vedi paragrafo

2.5.3.1.3) che identificano il range di pressione all'interno del quale si vuole stimolare il campione durante l'esperimento. Il ciclo quindi si basa su un confronto in tempo reale tra il valore della pressione che agisce sul campione, acquisito dal SW nel *ciclo di acquisizione* e passato al *ciclo di controllo* (1A e 1B di Figura 3.2) tramite una variabile locale, e i due valori di soglia impostati. Il SW quindi invia il segnale di cambio fase alla pompa solo al raggiungimento del valore di soglia impostato dall'utente tramite l'interfaccia utente. Per la fase di rest, di nuovo, permane il controllo sul tempo, in quanto la pressione potrebbe variare durante la fase rest ma non per effetto della pompa (pompa ferma) e quindi la durata di questa fase è determinata unicamente dal valore temporale settato dall'utente. Una volta raggiunto il valore di soglia della pressione, inoltre, il SW verifica che il valore raggiunto rimanga sopra/sotto la soglia per un intervallo di tempo sufficiente, anch'esso definito dall'utente tramite interfaccia utente. Questo doppio controllo permette di evitare un cambio di fase errato dovuto ad improvvisi ed inattesi *spike* di pressione (si veda il paragrafo 2.5.3.1.3).

Per verificare l'efficacia di questa modalità è stato effettuato una prova di collaudo utilizzando un set up sperimentale, che verrà successivamente impiegato per la caratterizzazione meccanica di tessuti (paragrafo 4.3.1). Nel set up della prova di collaudo è stato impiegato un bioreattore a perfusione realizzato in un precedente lavoro di tesi presso il µBS Lab [27]. In Figura 3.10 è mostrato in dettaglio il bioreattore a perfusione impiegato.

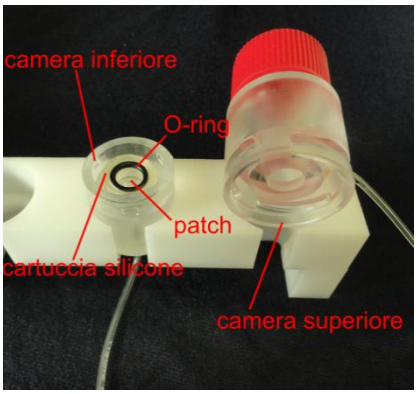


Figura 3.10 Bioreattore a perfusione impiegato per la verifica della modalità di controllo limitata in pressione. Sono indicati la camera inferiore e superiore, la cartuccia di silicone, il patch di lattice, l'O-ring per il fissaggio del patch alla cartuccia.

Il bioreattore è composto da due camere: la camera inferiore alloggia la cartuccia in silicone su cui è fissato un patch di lattice tramite un O-ring, mentre la camera superiore si serra sulla camera inferiore per bloccare la cartuccia di silicone. È stato impiegato un patch in lattice, con la funzione di simulare un tessuto biologico deformabile.

In Figura 3.11 è mostrato il set up impiegato per questa prova di collaudo.

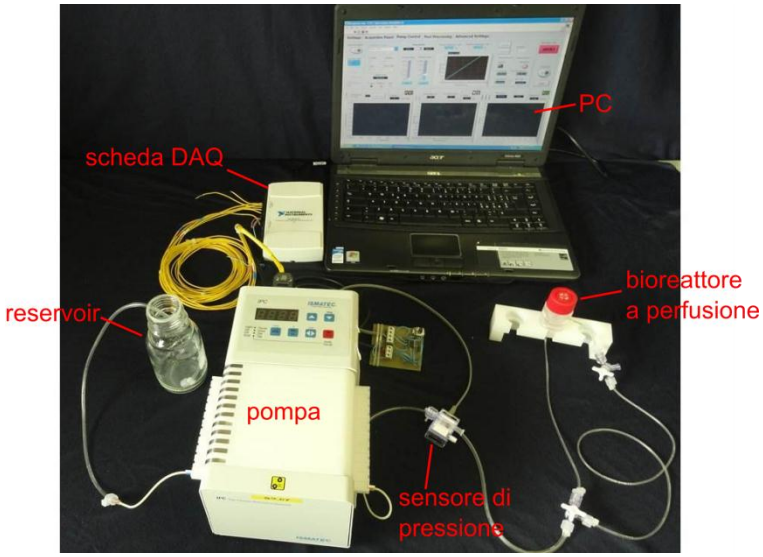


Figura 3.11 Set up per la verifica della modalità di controllo limitata in pressione. Sono indicati: il PC, la scheda NI DAQ, la pompa, il reservoir da cui la pompa preleva il liquido, il sensore di pressione Pendotech PRESS-S-000, il bioreattore a perfusione in cui è inserito il patch di lattice.

La pompa (Ismatec IPC-N12) preleva il liquido da un reservoir e lo infonde nel bioreattore, sollecitando così il patch. Il set up prevede anche l'utilizzo di un sensore di pressione (Pendotech PRESS-S-000) posto in serie nel circuito idraulico, a valle della pompa e a monte del campione, per monitorare la pressione che agisce sul patch. Si è quindi sottoposto il patch a sollecitazioni cicliche con pattern di stimolazione infusione-aspirazione-rest (IWR) con portata di infusione pari a 5 µl/min e portata di aspirazione pari a 50 µl/min. Le soglie di controllo della pressione impostate sono pari a 0 (soglia minima) e 40 mmHg (soglia massima) che definiscono quindi il range di pressione con cui si vuole stimolare il patch.

Come si può osservare in Figura 3.12, che riporta l'andamento della pressione nel tempo; per tutta la durata della stimolazione il valore di pressione si è mantenuto all'interno del range desiderato (0-40 mmHg) senza derive del segnale di pressione.

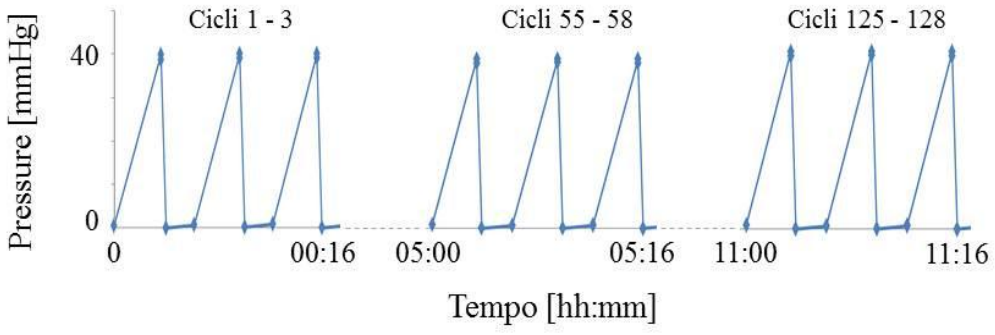


Figura 3.12 Tracciato delle curve di pressione rispetto al tempo in modalità automatica in limitazione di pressione ricavate dalla prova di collaudo del SW con il bioreattore a perfusione e patch di lattice.

A valle di questo collaudo non è stato quindi necessario apportare alcuna modifica all'architettura del SW per questa modalità di controllo.

3.3 Temporizzazione del ciclo di controllo

Come anticipato nel paragrafo 3.1.1.1, il ciclo while di controllo (1A in Figura 3.2) è eseguito ad intervalli temporali pari a 20 ms. Questa scelta è stata fatta in base al monitoraggio del tempo effettivo di esecuzione del ciclo.

Si è innanzitutto provveduto all'ottimizzazione dell'architettura del SW. Per far ciò si sono ad esempio spostate fisicamente tutte le operazioni che riguardano l'elaborazione delle finestre grafiche e il loro aggiornamento in cicli paralleli rispetto al ciclo principale. Nell'ambiente di programmazione LabVIEW® l'aggiornamento in tempo reale delle finestre grafiche richiede, infatti, risorse di calcolo elevate che comporterebbero quindi tempi di esecuzione del ciclo più lunghi. Inoltre, si è cercato di minimizzare l'utilizzo delle variabili locali per non rallentare il ciclo principale a causa del passaggio dei dati memorizzati in una variabile locale contenuta in un ciclo ad una contenuta in un ciclo esterno/parallelo. Al termine dell'ottimizzazione si è riusciti a ridurre il tempo di esecuzione di un singolo passo del ciclo while di controllo ad un valore (medio) nell'ordine dei 2 ms. Al fine di garantire che il ciclo di controllo venga effettivamente eseguito sempre nell'intervallo temporale desiderato, si è deciso di scalare, aumentandolo di un fattore dieci, il tempo di esecuzione stimato (2 ms), assegnando quindi un valore di temporizzazione pari a 20 ms. Si è scelto questo valore in quanto si è ritenuto essere accettabile per le applicazioni previste per l'utilizzo del sistema di controllo, anche alla luce della lista delle specifiche di progetto definite nel paragrafo 2.3. Infatti, 20 ms è un valore che permette un'esecuzione comunque sufficientemente rapida delle operazioni di monitoraggio e controllo sui parametri della stimolazione rispetto alle dinamiche delle sollecitazioni imposte: questo SW è stato progettato e realizzato per applicazioni che richiedono sollecitazioni cicliche la cui durata delle fasi spazia dalle ore ai secondi e quindi comunque sempre maggiore di almeno due ordini di grandezza rispetto al valore della temporizzazione imposta per l'esecuzione del ciclo principale (20 ms).

Per quanto riguarda i cicli *while* ausiliari del SW sviluppato (cicli 2, 3, 4, 5 in Figura 3.2) la temporizzazione scelta è stata di un ordine di grandezza superiore rispetto a quella del ciclo *while* di controllo (20 ms). I cicli sono stati temporizzati in modo da eseguire le proprie operazioni ogni 200 ms, valore che permette un aggiornamento sufficientemente frequente delle finestre grafiche dei cicli *while* 3 (*Volume Cycle*) e 4 (*P(V) Cycle*) di Figura 3.2 e consente di svolgere in tempi ragionevoli le operazioni richieste nel ciclo *while* dedicato al *post processing*.

Infine il ciclo *while* n° 2 (*Property Node*) è stato temporizzato con lo stesso valore dei 3 precedenti per uniformare la temporizzazione di tutti i cicli ausiliari.

3.4 Calibrazione del segnale di tensione della pompa in valori di portata

Come illustrato nel paragrafo 2.2.1.1, il valore di portata che la pompa deve garantire può essere gestito inviando al motore della pompa un segnale di tensione compreso tra 0 e +5 V. L'utente deve però avere la possibilità di impostare direttamente il valore di portata (in RPM% o in ml/min) e non settare un valore di tensione. Occorre quindi implementare nell'architettura del SW, una retta di calibrazione che trasformi il valore di portata espressa in RPM% o ml/min settato dall'utente in un valore di tensione che il SW invia alla pompa.

3.4.1 Calibrazione per il controllo della portata espressa in RPM%

Si è inizialmente proceduto alla calibrazione per il controllo della portata espressa in RPM% in quanto questa modalità di controllo della portata è indipendente dal sottopompa utilizzato. Tramite il pin 9 (paragrafo 2.2.1.1) della pompa è stato acquisito il segnale di tensione erogato dal motore e proporzionale alla velocità di rotazione dei rulli comandando la pompa manualmente, ovvero impostando diversi valori di RPM% tramite il suo display. Questo segnale è compreso tra 0 e +10 V. In questo modo si è ricavata la retta di calibrazione che associa il valore di portata settato al valore di tensione da inviare alla pompa. I parametri della retta di calibrazione (pendenza e intercetta) sono stati implementati nel SubVI *RPM%* nel ciclo di controllo del SW così da calibrare la variabile *Volt Speed Out* (Figura 3.5) che determina la portata della pompa.

Per effettuare la calibrazione è stato realizzato un cablaggio differente da quello descritto nel paragrafo 2.2.1.1, poiché era necessario acquisire il segnale di tensione impostando però manualmente la portata, tramite i comandi sul display della pompa.

La Tabella 3.2 descrive il cablaggio effettuato per interfacciare la pompa con la scheda NI DAQ.

Porta a 15 Pin Funzione associata (Pin)	**DAQ NI USB-6211** Tipo di canale (morsetto)
Ground (1,2)	AI GND (28)
Start-Stop (3)	AI GND (28)
Speed out (9)	AI 0 (15)

Tabella 3.2 Tabella riassuntiva delle connessioni dei 4 pin della porta analogica della pompa cablati sulla scheda DAQ USB-6211.

Al termine di questa fase si è proceduto poi ad acquisire nuovamente la tensione in uscita dalla pompa ma comandando la pompa via SW, ovvero imponendo via SW diversi valori di portata in RPM%. Questa acquisizione è stata fatta tramite il cablaggio illustrato nel paragrafo 2.2.1.1.
Ci si aspetterebbe che i valori di tensione acquisiti comandando la pompa via SW siano uguali a quelli registrati comandandola via display, poiché la calibrazione del SW è stata fatta proprio sulla base dei valori acquisiti dalla pompa comandandola da display. Dall'analisi dei dati si evidenzia invece una discrepanza tra i valori di tensione ottenuti comandando la pompa da display e da SW. In Tabella 3.3 sono riportati i valori di tensione acquisiti nelle due modalità.

Portata impostata [RPM %]	**Tensione acquisita**		
	Controllo via display [V]	**Controllo via SW [V]**	**Differenza Display - SW [V]**
0	-0.00592	-0.00577	-0.00015
1	0.08994	-0.00728	0.09722
1.5	0.13662	-0.00559	0.14221
2	0.19143	0.04586	0.14556
2.5	0.24038	0.07090	0.16948
3	0.28807	0.11244	0.17563
3.5	0.34476	0.15423	0.19053
4	0.38820	0.19273	0.19548
4.5	0.44024	0.24131	0.19892
5.00	0.47921	0.32043	0.15879
7.50	0.72830	0.55605	0.17226
10.00	0.96616	0.80448	0.16167
20.00	1.95215	1.78016	0.17198
50.00	4.84972	4.69650	0.15322
80.00	7.74037	7.61621	0.12416
90.00	8.73271	8.59879	0.13392
95.00	9.21289	9.08156	0.13132
98.00	9.49992	9.35713	0.14279
100.00	9.67007	9.56009	0.10999

Tabella 3.3 Analisi dei valori di tensione in uscita dal motore della pompa acquisiti per diversi valori di RPM% impostati via display e via SW. L'ultima colonna contiene la differenza tra i valori acquisiti nelle due modalità di controllo della pompa

La Figura 3.13 mostra le due rette di calibrazione ottenute interpolando i dati di Tabella 3.3.

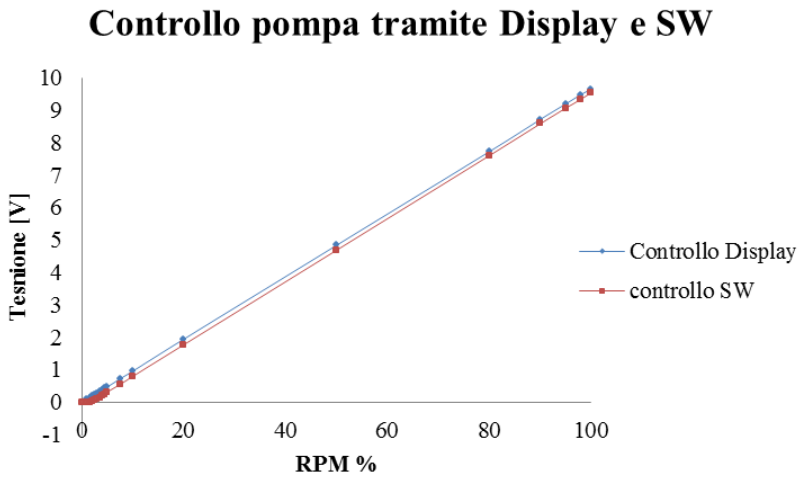


Figura 3.13 Rette di calibrazione ottenute interpolando i dati della Tabella 3.3 per le modalità di controllo della pompa via Display e via SW.

La colonna dei dati "Differenza Display-SW [V]" in Tabella 3.3 e la differenza tra le due rette di Figura 3.13, consentono di quantificare quantitativamente e qualitativamente la differenza tra i valori di tensione acquisiti comandando la pompa nelle due diverse modalità. Sulla base di questi dati si è proceduto quindi a correggere la retta di calibrazione da implementare nel SW, modificando il valore dell'intercetta di un valore pari alla metà del valore della differenza calcolata. Si è utilizzato la metà del valore della differenza poiché mentre il segnale di tensione acquisito è nel range 0-10 V il segnale di tensione con cui si varia la portata della pompa varia tra 0-5 V. Si è quindi verificato che la retta di calibrazione modificata garantisse una corrispondenza tra la portata in RPM% impostata via SW e la portata in RPM% letta sul display della pompa utilizzando come valori di intercetta quelli indicati in Tabella 3.4.

Portata impostata via software [RPM %]	**Indicazione display pompa [RPM %]**	Intercetta retta di calibrazione [V]	
1	0/0.4	0.04905	
3	2.9	0.08826	
5	5	0.07984	
7.5	7.5	0.08657	
10	10	0.08128	
20	20	0.08644	q medio range 0-33 %: 0.08448
50	50	0.07705	
80	80	0.06252	
90	90	0.06740	
95	95	0.06611	
100	100	0.05544	q medio range 33-100 %: 0.06827

Tabella 3.4 Confronto tra valori impostati via SW e valori letti sul display della pompa in base al valore di intercetta modificato nella retta di calibrazione.

Si può osservare come ci sia ora una buona corrispondenza tra i valori acquisiti comandando la pompa via SW e letti sul display. Analizzando i risultati e i valori di intercetta utilizzati per ogni singolo valore di portata impostato, si è pensato di individuare due valori di intercetta (q medio in Tabella 3.4): il primo che ottimizzasse la calibrazione nell'intervallo di portate tra 0 e 33 RPM% ed un secondo nell'intervallo tra 33 e 100 RPM%. Questi due valori di intercetta sono stati poi implementati nel SW, che è quindi in grado di impiegare l'uno o l'altro, a seconda del valore di RPM% impostato dall'utente.
Da questa analisi si è notato inoltre che l'incremento minimo rilevabile dalla pompa impostando la portata via SW è pari 0.5 RPM%.

3.4.2 Calibrazione della portata espressa in ml/min

Si è proceduto a calibrare il valore di portata espresso in ml/min rispetto al valore di tensione erogato dal motore della pompa per consentire all'utente che utilizza il SW di impostare la portata in ml/min.
Per far ciò:

- tramite il menù della pompa (manualmente, tramite display) si è impostato il diametro interno del sottopompa impiegato;
- tramite menù della pompa si è selezionata la modalità di indicazione della portata in ml/min;
- comandando la pompa via SW si sono impostate diverse portate in RPM% utilizzando la retta di calibrazione descritta nel paragrafo 3.4.1;
- tramite il display della pompa si è letto il valore di portata in ml/min corrispondente al valore impostato via SW in RPM%.

Si è quindi così ricavata la retta di calibrazione della portata da RPM% in ml/min da implementare nel SW. Si è proceduto al calcolo della retta specifica per ogni diametro di sottopompa d'interesse. A titolo esemplificativo si mostra la relazione RPM%-ml/min ottenuta tramite la procedura di calibrazione appena descritta per il sottopompa con diametro interno di 0.25 mm (Figura 3.14).

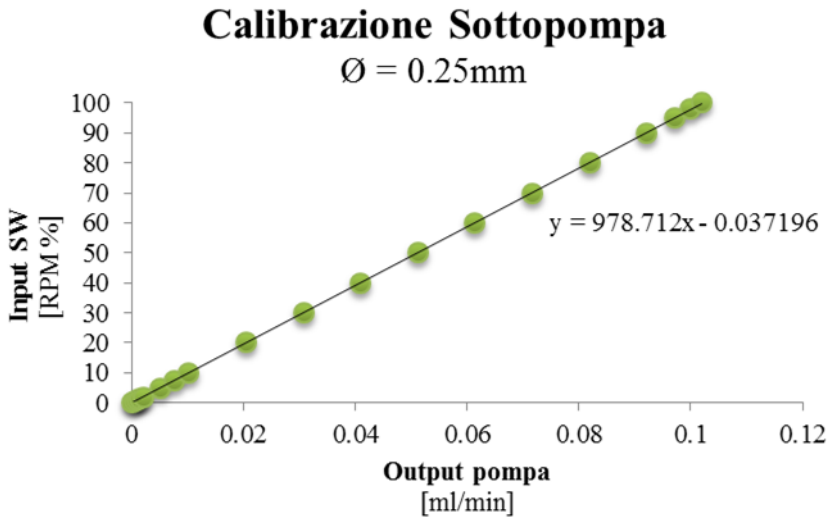


Figura 3.14 Retta calibrazione RPM%– ml/min per il sottopompa di diametro interno 0.25 mm.

3.4.3 Verifica della procedura di calibrazione della portata espressa in RPM% e ml/min

A valle della procedura di calibrazione, per verificare l'effettiva corrispondenza tra il volume erogato dalla pompa comandata via SW ed il volume erogato comandandola via display, sono state effettuate alcune prove misurando il peso del liquido (acqua demineralizzata) erogato in entrambe le modalità di comando della pompa, tramite una bilancia elettronica (Mark S422, Bel Engineering). Si assume la densità dell'acqua demineralizzata pari a 1 g/cm^3 così da poter ipotizzare l'equivalenza tra peso misurato e volume infuso. La prova è stata condotta per tubi con due differenti diametri interni: 0.25 mm e 1.02 mm. Per il sottopompa con diametro 0.25 mm si sono effettuate le prove infondendo per 5 min il liquido così da per poter apprezzare una variazione del peso maggiore della risoluzione della bilancia (0.01g) controllando la portata in RPM%. Per il sottopompa con diametro di 1.02 mm la durata dell'infusione è stata di 3 minuti imponendo una portata in ml/min. Per ogni prova si è impostato un valore di portata costante (in RPM% o ml/min) e si è misurato al termine della prova la variazione di peso. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 3.5.

	Ø = 0.25 mm				Ø = 1.02 mm		
	Peso misurato [g]						
Portata impostata [RPM %]	**Controllo via display**	**Controllo via SW**	**Differenza Display - SW**	**Portata impostata** [ml/min]	**Controllo via display**	**Controllo via SW**	**Differenza Display - SW**
1	-	-	-	0.0141	0.05	0.01	0.04
3	-	-	-	0.0423	0.11	0.11	0
5	0.02	0.03	-0.01	0.0705	0.23	0.23	0
7.5	0.05	0.05	0	0.10575	0.32	0.32	0
10	0.06	0.06	0	0.141	0.46	0.45	0.01
20	0.14	0.14	0	0.282	0.9	0.91	-0.01
50	0.36	0.35	0.01	0.705	2.29	2.28	0.01
80	0.58	0.56	0.02	1.128	3.67	3.66	0.01
90	0.65	0.63	0.02	1.269	4.14	4.12	0.02
95	0.67	0.66	0.01	1.3395	4.35	4.36	-0.01
100	0.71	0.7	0.01	1.41	4.59	4.58	0.01

Tabella 3.5 Risultati della misura del peso del volume erogato dalla pompa nelle due diverse modalità di controllo (display e SW).

Dall'analisi dei dati si può affermare che la differenza calcolata nelle due diverse modalità può essere ritenuta trascurabile ai fini delle applicazioni previste nell'ambito del presente lavoro di tesi.

Al termine delle prove di collaudo si è verificato come il SW sia in grado di eseguire le operazioni richieste in tutte le modalità di controllo messe a disposizione dell'utente. Nel capitolo 4 si mostrerà come il sistema di controllo realizzato è stato integrato in diversi set up per la caratterizzazione biomeccanica di tessuti biologici. In particolare si andranno ad analizzare i risultati sia dal punto di vista dei parametri biomeccanici valutati sia dal punto di vista dei vantaggi o svantaggio che l'integrazione del sistema di controllo ha portato.

4.

Monitoraggio e controllo di parametri di stimolazione di organi e tessuti biologici

4.1 Applicazione del sistema di controllo in esperimenti con campioni biologici

Al termine delle prove di collaudo descritte nel capitolo 3, effettuate per verificare il corretto funzionamento del sistema di controllo sviluppato nel presente lavoro di tesi, si è poi proceduto al suo effettivo utilizzo, integrando il sistema di controllo con 4 diversi set up sperimentali che prevedono la sollecitazione con fluido in pressione di tessuti e di organi biologici. I set up sperimentali sono stati precedentemente sviluppati da ricercatori del μBS Lab, nell'ambito di differenti progetti di ricerca ad oggi in corso presso il laboratorio. In questa fase del lavoro si è voluto verificare come l'integrazione di un sistema di controllo nei diversi set up potesse migliorare l'esecuzione e l'output degli esperimenti condotti. In tutti i casi, quindi, i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti in precedenti lavori svolti presso il μBS Lab o presenti in letteratura, in cui non è previsto un sistema di monitoraggio e controllo della stimolazione.

Dato il numero esiguo di esperimenti effettuati per ciascun tessuto/organo testato, occorre sottolineare come nel proseguo del capitolo si tenderà a dar maggior enfasi ai risultati delle prove condotte dal punto di vista dal comportamento del sistema di controllo e dei vantaggi operativi che esso ha consentito di ottenere nei diversi ambiti in cui è stato utilizzato, rispetto all'effettivo significato dei risultati ottenuti. Infatti, l'obiettivo principale del presente lavoro di tesi è lo sviluppo di un sistema di controllo dotato di ampia versatilità e non il suo utilizzo in campagne sperimentali estensive finalizzate allo studio del comportamento dei tessuti stimolati. I risultati più significativi ottenuti con campioni biologici verranno comunque descritti e ove possibile discussi e confrontati con i dati presenti in letteratura.

Come introdotto nel capitolo 2, il sistema di controllo è stato utilizzato in set up sperimentali finalizzati alla caratterizzazione biomeccanica di tessuti biologici e alla gestione di un protocollo

di decellularizzazione. Nello specifico il sistema di controllo è stato integrato in 4 differenti set up utilizzati in differenti ambiti di ricerca nel campo dell'ingegneria dei tessuti:

1) caratterizzazione delle proprietà di distensibilità (compliance) di campioni di vena safena umana;
2) misura della permeabilità di un patch di tessuto biologico decellularizzato (vescica del modello animale del coniglio) attraverso controllo del volume infuso e monitoraggio della pressione agente sul patch;
3) caratterizzazione delle proprietà di distensibilità (compliance) di un organo intero decellularizzato (vescica del modello animale del coniglio), rispetto all'organo nativo, attraverso test di cistometria;
4) decellularizzazione dinamica di organo intero (vescica del modello animale del coniglio) attraverso infusione/aspirazione degli agenti decellularizzanti;

I set up messi a punto per condurre le prove e i risultati ottenuti sono descritti nei paragrafi seguenti.

4.2 Prove di misura di compliance di campioni di vena safena umana

La prima applicazione in cui è stato utilizzato il sistema di controllo sviluppato nell'ambito del presente lavoro di tesi è la caratterizzazione del comportamento biomeccanico di una vena safena umana, ed in particolare l'analisi delle proprietà di distensibilità del vaso in risposta ad una sollecitazione di tipo pressorio.

Tale analisi si inserisce all'interno di un progetto di ricerca più ampio, condotto dai ricercatori del μBS Lab in collaborazione con il personale del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare (LIT) del Centro Cardiologico Monzino di Milano. Lo scopo del progetto è quello di analizzare il fenomeno dell'arterializzazione della vena safena, in conseguenza del suo impiego come graft per bypass aorto-coronarici. Dalla letteratura scientifica, infatti, si evince come la vena safena, una volta impiantata nell'albero coronarico del miocardio, subisca una modificazione strutturale, fenomeno che prende il nome di rimodellamento del tessuto del vaso. Tale rimodellamento è un processo biologico che avviene in risposta alla sollecitazione non fisiologica che la vena subisce nel sito di impianto: dopo l'impianto, infatti, la vena viene sottoposta ad una pressione, quella coronarica, di tipo pulsatile nel range 80-120mmHg, contro 0-10 mmHg, associati ad una pulsatilità nulla, a cui la vena è sottoposta fisiologicamente [28]. Tale fenomeno porta, nell'arco di pochi anni, all'ispessimento della tunica muscolare del vaso che causa una graduale riduzione del lume fino alla sua completa

occlusione [29]. La totale occlusione del vaso comporta la drastica riduzione dell'apporto di sangue alla porzione di muscolo cardiaco che esso dovrebbe servire, con conseguente insorgenza di fenomeni ischemici. In definitiva, in tali condizioni, si ha la necessità di un nuovo intervento chirurgico per la sostituzione del vaso occluso.

Uno dei primi step relativi all'analisi del fenomeno dell'arterializzazione del vaso consiste nella caratterizzazione delle proprietà biomeccaniche, ed in particolare delle proprietà di distensibilità del vaso nella nuova condizione di sollecitazione pressoria a cui essa è sottoposta dopo l'impianto. Per poter valutare e quantificare la variazione del comportamento biomeccanico della vena è però necessario caratterizzarne il comportamento in condizioni fisiologiche. A tal fine la camera di coltura utilizzata per la stimolazione del vaso è stata connessa al sistema di controllo attraverso il quale è stato possibile eseguire la caratterizzazione della distensibilità di un campione di vena safena umana in condizioni fisiologiche. In particolare, il SW è stato utilizzato per i) il controllo degli attuatori del circuito idraulico, ii) il monitoraggio del segnale di pressione all'interno della vena (si veda il protocollo sperimentale descritto nel paragrafo 4.2.1), iii) la registrazione e la post elaborazione dei dati acquisiti.

4.2.1 Protocollo di prova

Il test consiste nell'infusione controllata di un volume di liquido nel vaso e permette di monitorare la relativa variazione di pressione interna al vaso. Nel dettaglio, la prova condotta ha permesso di determinare la relazione tra la variazione del volume di fluido infuso all'interno dell'organo (ΔV) tramite una pompa peristaltica e la variazione della pressione all'interno del vaso (ΔP), attraverso un sensore di pressione. Il rapporto tra queste due grandezza fisiche è detta compliance (C), parametro che dipende dalle proprietà meccaniche del tessuto ed indice del grado di distensibilità del vaso (Eq. 1).

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P} \qquad [ml\ /\ mmHg] \tag{1}$$

La prova di misura della C, svolta presso il LIT del Centro Cardiologico Monzino, ha previsto l'impiego di un tratto di vena safena prelevata da un donatore umano. Il tratto di vena safena utilizzato ha un diametro interno pari a 1.8 mm e una lunghezza complessiva di 28 mm. La vena è stata montata all'interno di un sistema di coltura, realizzato in un precedente lavoro di tesi [5], composto da una camera di coltura che permette di alloggiare e vincolare il tratto di vena e di stimolarlo attraverso un opportuno circuito idraulico. L'infusione è garantita da una pompa

volumetrica mentre il monitoraggio della pressione interna del vaso è possibile tramite un sensore di pressione interfacciato con un SW di acquisizione. In Figura 4.1 sono mostrati il telaio interno della camera di coltura e i connettori per fissare il vaso nella camera.

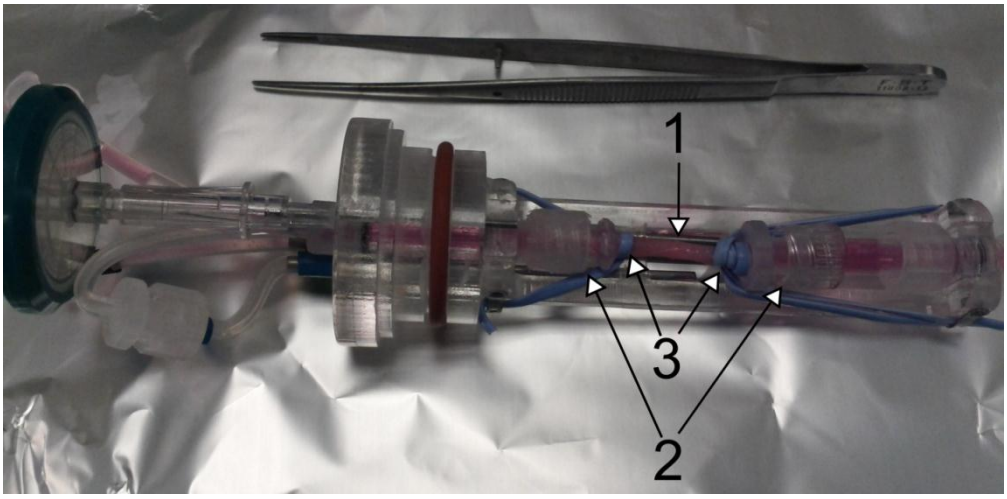


Figura 4.1 Particolare del telaio della camera di coltura in cui è stato alloggiato e fissato il campione di vena safena (1); tramite degli appositi connettori (2) il lume del vaso è connesso al circuito idraulico per la perfusione del vaso; due vessel loop (3) consentono di fissare il vaso ai connettori.

Il vaso è fissato tramite vessel loop, ad appositi connettori integrati nel telaio della camera e collegati al circuito idraulico del set up. Questo sistema di ancoraggio permette di mantenere in sede il vaso per tutta la durata della prova ma comporta una riduzione della lunghezza utile del vaso da 28 mm a 18 mm.

Il telaio della camera di coltura su cui è alloggiato il vaso, mostrato in Figura 4.1, è stato poi inserito in un tubo Falcon da 50 ml riempito di soluzione buffer (PBS). Tramite una guarnizione in gomma siliconica (o-ring), per interferenza geometrica, si serrano i due elementi (telaio e Falcon) così da creare un ambiente chiuso e sterile per la stimolazione.

Il set up sperimentale realizzato per la misura della compliance del campione di vena è mostrato in Figura 4.2.

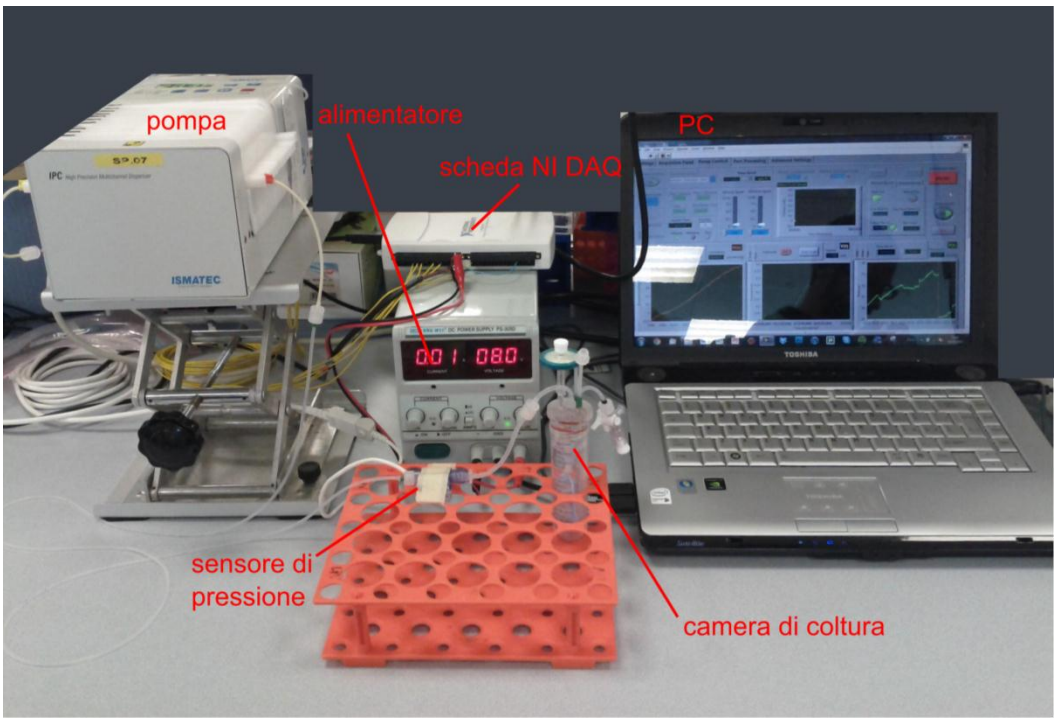


Figura 4.2 Set up sperimentale realizzato per la misura della compliance della vena safena. Sono messi in evidenza: la pompa volumetrica, la scheda NI DAQ, l'alimentatore da banco che fornisce la tensione di alimentazione al sensore di pressione, il sensore di pressione, la camera di coltura ed il PC su cui viene eseguito il SW di controllo.

Il set up è composto da:

- una pompa peristaltica (IPCN-12, Ismatec) in grado di infondere il vaso con una portata costante. La pompa è controllata via SW come descritto nel capitolo 2;
- un sensore di pressione di tipo *flow-through* (Pendotech Press-S-000) e il suo circuito di amplificazione (paragrafo 2.2.2) connessi tramite scheda NI DAQ USB-6211 al PC su cui viene eseguito il SW di controllo. Il sensore permette il monitoraggio in tempo reale del valore di pressione all'interno del vaso in risposta all'incremento del suo volume interno durante l'infusione del fluido processato dalla pompa;
- un alimentatore da banco, che consente di alimentare il sensore di pressione (al momento della prova non era ancora stato realizzato il sistema miniaturizzato di alimentazione del sensore Pendotech descritto nel paragrafo 2.2.2.1);
- il SW di controllo sviluppato nel presente lavoro di tesi;
- una camera di coltura che permette di alloggiare e stimolare il campione di vena safena [5].

La pompa preleva il fluido (PBS) da un reservoir (reservoir di mandata) posto a monte della pompa e infonde il fluido all'interno della vena alloggiata nel camera di coltura. L'estremità finale della vena è fissata ad un connettore cieco; ciò permette di mettere in pressione il vaso

attraverso l'infusione del fluido. Tra la pompa e la camera di coltura è inserito, in serie, il sensore di pressione, così da monitorare il valore di pressione all'interno del vaso.

In Figura 4.3 viene schematicamente rappresentato il circuito idraulico appena descritto.

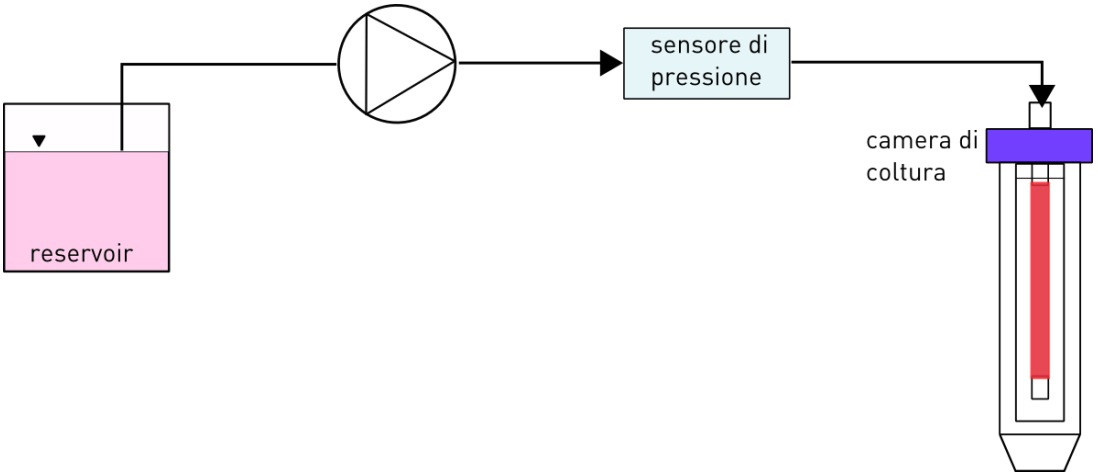


Figura 4.3 Schema del circuito idraulico della prova per la misura della compliance di un vaso. Si notano: reservoir, pompa, sensore di pressione, camera di coltura.

La prova è stata realizzata utilizzando il SW del sistema di controllo in modalità automatica in limitazione di pressione (paragrafo 2.5.3.1.3), ovvero abilitando l'infusione/aspirazione del fluido all'interno del vaso fino al raggiungimento delle soglie di pressione minima e massima, rispettivamente pari a 0 e 10 mmHg, ovvero il range di pressione fisiologico per la vena safena umana [28].

Prima di procedere con la misura della compliance, sono stati eseguiti 14 cicli di precondizionamento del vaso, finalizzati a riportare il tessuto in esame in una condizione di omeostasi. Infatti, a causa della sua viscoelasticità il tessuto vascolare non ha uno stato "naturale" in cui ritorna dopo la rimozione di una sollecitazione esterna (in questo caso la pressione imposta). Esiste però una condizione di omeostasi nella quale il tessuto raggiunge una condizione di equilibrio meccanico e biochimico; questa condizione si raggiunge caricando il campione ciclicamente (precondizionamento) [30]. Prima di procedere con la prova è quindi necessario riportarsi in questa condizione per ottenere risultati ripetibili. Il precondizionamento del vaso è stato realizzato imponendo una portata di infusione pari a 0.02 ml/min fino al raggiungimento di un valore di pressione interna al vaso pari a 10 mmHg, seguita da una fase di aspirazione del fluido precedentemente infuso, con una portata di 0.02 ml/min, fino al raggiungimento di un valore di pressione nulla all'interno del vaso. Tra un ciclo di precondizionamento ed il successivo si è atteso un tempo pari a 5 min in cui il vaso è stato mantenuto a pressione interna nulla (fase di *recovery*). La fase di rest è funzionale a far si che il

valore della pressione acquisita dal sensore si assesti effettivamente al valore di 0 mmHg al fine di non falsare l'acquisizione del dato nella successiva fase di infusione. Al termine della fase di precondizionamento, dopo ulteriori 5 min in cui il vaso è stato mantenuto in condizione di pressione interna nulla, sono state effettuate le prove di misura di compliance. Sono state effettuate due differenti prove impostando, tramite il SW di controllo, due differenti portate di infusione, pari a 0.02 e 0.04 ml/min, al fine di indagare l'influenza che questo parametro potesse avere in termini di risposta meccanica del vaso. In entrambe le prove è stato quindi monitorato il volume sequestrato all'interno dell'organo (ΔV Eq. 1) e la risposta del vaso in termini di incremento di pressione interna (ΔP, Eq. 1). Per ogni valore di portata sono state eseguite due misure di compliance per valutare la ripetibilità del comportamento del vaso.

4.2.2 Risultati Sperimentali

Come detto in precedenza, sono stati eseguiti 14 cicli di precondizionamento del vaso. A valle dei 14 cicli di precondizionamento, non si è giunti ad una effettiva riduzione dell'area di isteresi della curva P-V, definita come l'area compresa tra la curva P-V di infusione e quella di aspirazione, tra un ciclo di carico/scarico e il ciclo successivo. Nonostante ciò, si è deciso di procedere ugualmente con il test di misura della compliance, per non giungere a deterioramento del tessuto della vena.

Al termine della prova è stata valutata la relazione che lega l'incremento di pressione all'interno del vaso all'aumento di volume di fluido sequestrato durante l'infusione ed in definitiva si è stimato il valore della compliance del vaso. La Figura 4.4 mostra le curve ottenute durante la prova.

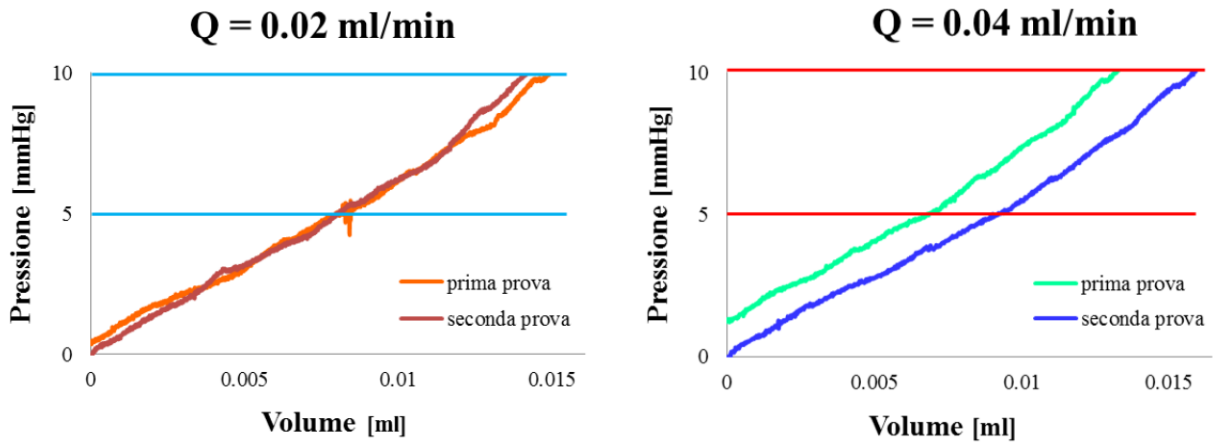


Figura 4.4 Curve P-V del vaso nelle due condizioni di prova Q=0.02 ml/min (pannello di sinistra) e Q=0.04 ml/min (pannello di destra). Le rette azzurre (Q=0.02 ml/min) e rosse (Q=0.04 ml/min) identificano il tratto di curva in cui è stato calcolato il valore di compliance.

La compliance del vaso è stata quindi stimata nel tratto lineare delle curve riportate in Figura 4.4, compreso tra 5 e 10 mmHg. Il valore di compliance è stato calcolato come rapporto incrementale tra le variazioni di volume, normalizzate rispetto il volume interno del vaso (V_0), e gli incrementi di pressione:

$$C = \frac{\left(\frac{\Delta V}{V_0}\right)_2 - \left(\frac{\Delta V}{V_0}\right)_1}{P_2 - P_1} \qquad [mmHg^{-1}] \tag{2}$$

Nell'equazione (2), il pedice 2 indica il valore di volume/pressione corrispondente al valore massimo di volume/pressione del tratto in cui si è calcolata la compliance, mentre il pedice 1 il valore minimo. Il volume interno (V_0) del vaso in condizioni scariche (cioè il valore del volume all'inizio della prova associato alla pressione di 0 mmHg) è stato calcolato essere pari a 43 µl.

Il valore medio di compliance ricavato per la prova condotta a Q=0.02 ml/min è pari a 0.0312 ± 0.0045 $mmHg^{-1}$ mentre per il vaso sollecitato con una portata di Q=0.04 ml/min è pari a 0.0301 ± 0.0006 $mmHg^{-1}$. I valori di compliance ottenuti sono stati confrontati con i valori riportati in un precedente lavoro di tesi, svolto presso il µBS Lab [5]. In questo lavoro sono stati analizzati 5 segmenti venosi. Il valore medio di compliance, nel range di pressione 5-10 mmHg è stato calcolato pari a 0.0522 ± 0.0122 $mmHg^{-1}$. Si osserva come i valori di compliance misurati durante le prove effettuate con il sistema di controllo sviluppato nel presente lavoro di tesi siano paragonabili a quelli riportati nel precedente lavoro [5].

Al di là della corrispondenza del risultato biologico, occorre però porre l'attenzione sui vantaggi che il sistema di controllo sviluppato nel presente lavoro di tesi ha portato nel protocollo sperimentale per il calcolo del valore di compliance di un vaso venoso.

I dati con cui ci si è confrontati [5] sono stati ottenuti utilizzando un set up messo appunto in un secondo lavoro di tesi svolto presso il µBS Lab [31]. In questo set up, il calcolo del valore di compliance è basato sull'imposizione di valori noti di pressione tramite uno sfigmomanometro e la misura del volume di liquido sequestrato dal vaso. Il set up è composto da i) un sistema per l'alloggiamento del vaso e ii) una camera di misura della compliance, collegata al sistema di alloggiamento. La camera di misura della compliance è costituita da una cannula graduata posta in posizione orizzontale collegata in serie al vaso e connessa allo sfigmomanometro. Inoltre è presente un foglio di carta millimetrata (solidale con la cannula graduata) che consente di leggere i valori di volume sequestrato dal vaso durante la prova. Il protocollo prevede che vengano (manualmente da parte dell'utente) imposti tramite lo sfigmomanometro incrementi successivi

del valore di pressione, pari a 10 mmHg. Il volume sequestrato dal vaso viene quindi stimato rispetto alla nuova posizione che il menisco di fluido assume nella cannula graduata, in risposta all'incremento di pressione, attraverso la carta millimetrata. Appaiono evidenti le criticità sperimentali nell'effettuare una misura di compliance con questo set up, sia per la difficoltà di imporre precisamente il valore di incremento di pressione desiderato, sia per quanto riguarda la ripetibilità dei valori imposti durante varie prove. Anche la valutazione del volume sequestrato dal liquido tramite lettura su carta millimetrata risulta essere poco accurata.

Tramite invece l'utilizzo del SW del sistema di controllo, è possibile impostare le soglie di pressione entro cui si vuole mantenere la sollecitazione, monitorando l'andamento della pressione in tempo reale, assicurando così che il protocollo di prova non sia affetto da errori introdotti dalle operazione manuali da parte dell'utente e sia inoltre ripetibile. Inoltre, il SW permette di monitorare e registrare il valore di volume infuso dalla pompa, rendendo quindi più semplice ed accurato il calcolo del volume di liquido sequestrato dal vaso.

Ulteriore vantaggio che l'impiego del sistema di controllo sviluppato può garantire, è la riduzione del tempo necessario per condurre la prova. Tramite il SW la fase di precondizionamento è resa automatizzata, eliminando i tempi aggiuntivi che l'intervento manuale dell'utente comportava nella procedura di carico e scarico della pressione interna del vaso.

4.3 Prove di premeabilità di un patch di tessuto urovescicale decellularizzato

In questa specifica prova si è utilizzato il sistema di controllo per l'analisi della variazione delle proprietà di permeabilità di un patch di tessuto urovescicale, del modello animale del coniglio, a valle del processo di decellularizzazione del tessuto.

In particolare, lo scopo dell'analisi è stato quello di quantificare l'effetto indotto dalla rimozione delle cellule uroteliali, che *in vivo* rappresentano la barriera naturale alla fuoriuscita dell'urina contenuta in vescica, così come delle cellule muscolari presenti nello strato più interno della parete dell'organo, che causa un aumento della porosità della matrice extracellulare, in termini di filtrazione di un fluido in pressione attraverso le pareti del patch decellularizzato. La valutazione del grado di permeabilità di un tessuto decellularizzato è importante poiché, nell'ottica di una futura applicazione del tessuto come patch da impiantare *in vivo* (eventualmente a valle di una ricellularizzazione del patch stesso), in sostituzione del tessuto patologico (intervento di

cistoplastica [32]), è necessario verificare l'assenza di fenomeni di filtrazione di urina dal lume interno della vescica verso il comparto addominale, per scongiurare l'insorgere di conseguenti gravi fenomeni infiammatori per il paziente [33, 34].

Per valutare l'effetto che la rimozione delle cellule ha sulla permeabilità del tessuto, i dati di permeabilità ottenuti sul tessuto decellularizzato sono stati confrontati con quelli del tessuto nativo, studiato nell'ambito di un precedente lavoro di tesi [35].

Il test di permeabilità condotto ha permesso di valutare il coefficiente di permeabilità K caratteristico della matrice del tessuto decellularizzato, definito, in accordo con la Legge di Darcy (equazione 3), come il rapporto tra il valore della portata con cui viene perfuso il tessuto (Q) e la differenza di pressione (ΔP) che si genera a cavallo del tessuto stesso:

$$K = \frac{Q}{\Delta \mathrm{P}} \tag{3}$$

Il sistema di controllo sviluppato è stato impiegato per poter i) controllare la portata di fluido tramite l'invio dei segnali dal software (SW) alla pompa, ii) monitorare in tempo reale l'andamento della pressione che agisce sul patch stimolato, iii) registrare i dati acquisiti e elaborarli al termine della prova.

4.3.1 Protocollo di prova

Le prove di permeabilità sono state condotte su patch di tessuto urovescicale decellularizzato, provenienti da una precedente campagna di decellularizzazione condotta presso il µBS Lab, sia con protocollo *dinamico* (cicli di infusione/aspirazione degli agenti decellularizzanti; i dettagli del protocollo sono riportati nel paragrafo 4.5) che *statico* (incubazione della vescica, riempita con un volume pari a 20 ml di soluzione decellularizzante, in un reservoir contenente la stessa soluzione) [36]. I campioni sono stati poi opportunamente conservati, fino al momento delle prove, attraverso criopreservazione alla temperatura di -80°C. I campioni sono stati congelati in medium di coltura DMEM (Sigma Aldrich) con aggiunta di soluzione DMSO (15%) per evitare la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno del tessuto che potrebbero danneggiarlo, dal punto di vista strutturale, al momento dello scongelamento [37]. Una volta scongelati (i campioni sono stati estratti dal congelatore ed immersi in un bagno termostatato con temperatura di 40°C per 10 min) i campioni sono stati lavati con soluzione fisiologica per eliminare i residui di medium e di DMSO [37]. Successivamente, da ciascun patch sono stati estratti dei provini circolari del diametro di circa 8 mm, ovvero della dimensione adatta per poter essere alloggiati

all'interno della bioreattore a perfusione utilizzato [27, 35] (descritto nel paragrafo 3.2.3) e sottoposti a test di permeabilità.

Come detto, il protocollo delle prove di permeabilità è stato mutuato da un precedente lavoro di tesi [35] condotto presso il µBS Lab. L'obiettivo della prova è quindi quello di monitorare la pressione che si genera a cavallo del patch in risposta ad una costante infusione di fluido erogato dalla pompa volumetrica.

Il set up realizzato è mostrato in Figura 4.5.

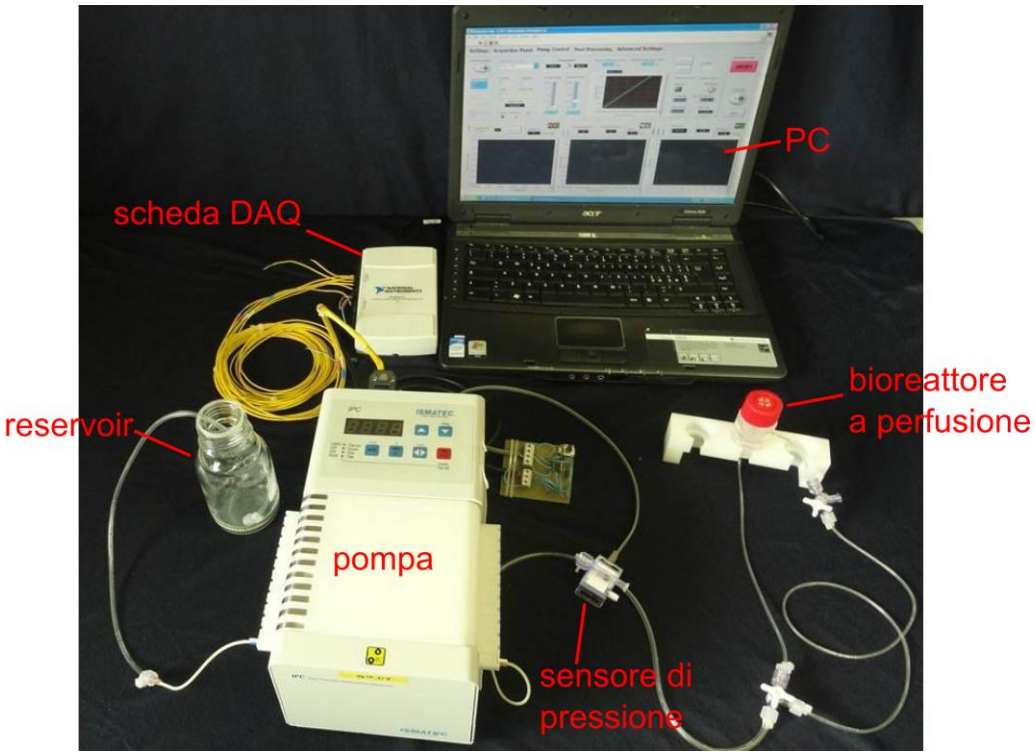


Figura 4.5 Set-up sperimentale per i test di permeabilità su patch di tessuto di vescica decellularizzata. Sono evidenti: reservoir, pompa volumetrica, scheda NI DAQ, sensore di pressione, bioreattore a perfusione, PC con il SW di controllo.

Il sistema è composto da:

- una pompa peristaltica (IPCN-12, Ismatec) utilizzate per infondere il fluido all'interno della camera e stimolare in pressione il patch di vescica. La pompa è controllata via SW come descritto nel capitolo 2;
- un sensore di pressione di tipo *flow-through* (Pendotech Press-S-000) comprensivo del suo circuito di amplificazione (paragrafo 2.2.2) connessi tramite scheda NI DAQ USB-6211 al PC su cui viene eseguito il SW di controllo. Permette il monitoraggio in tempo reale della caduta di pressione ai capi del campione di vescica;
- il SW di controllo sviluppato nel presenta lavoro di tesi;

- un bioreattore a perfusione che permette di alloggiare il campione circolare di vescica e mantenerlo in sede durante la perfusione del fluido. È stato impiegato un bioreattore a perfusione disponibile presso il μBS Lab, realizzato in un precedente lavoro di tesi [27] e riadattato, relativamente al componente che alloggia il patch di tessuto in questo tipo di prova, in un altro lavoro di tesi [35] svolto sempre presso il μBS Lab.
- un circuito idraulico che consente un facile riempimento del circuito e di ottimizzare le operazioni di alloggiamento e vincolo del patch di tessuto decellularizzato nel bioreattore a perfusione [35].

Uno schema del circuito idraulico realizzato è riportato in Figura 4.6.

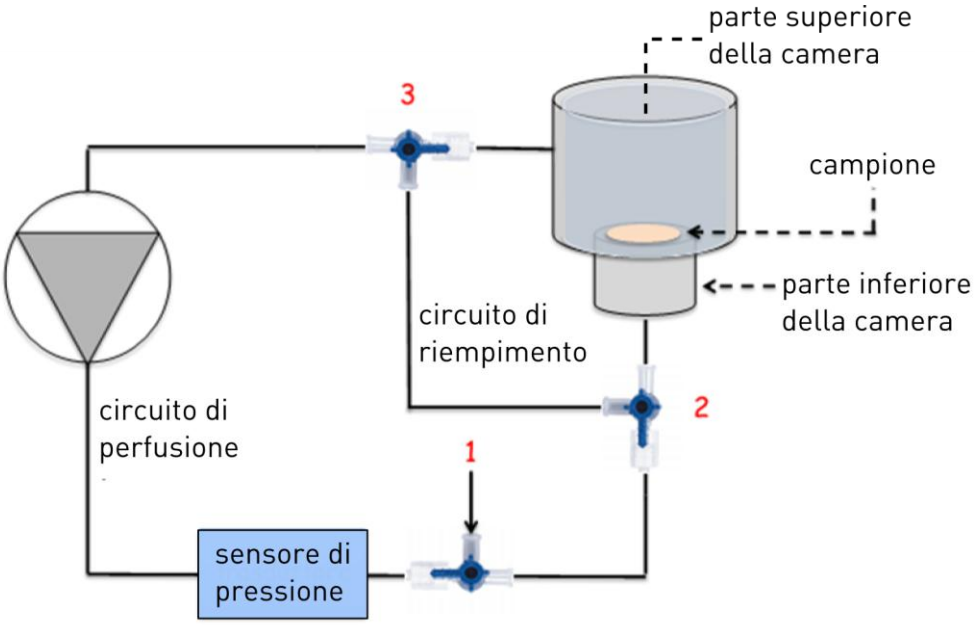


Figura 4.6 Schema idraulico del set-up sperimentale per la misura della permeabilità su provini circolari di matrice decellularizzata. I 3 rubinetti a tre-vie sono numerati e hanno funzioni differenti: il rubinetto 1 è il punto di accesso per il riempimento del circuito con il liquido utilizzato per la perfusione; i rubinetti 2 e 3 hanno il compito di isolare la camera di perfusione per favorire il corretto posizionamento del patch di vescica nella camera di coltura. Sono indicati anche i due elementi che compongono il bioreattore (camera inferiore e superiore), il sensore di pressione e la pompa.

I tre rubinetti a 3 vie evidenziati in figura consentono di debollare e riempire facilmente il circuito idraulico, secondo un protocollo sviluppato in un precedente lavoro di tesi [35]. Sono indicati, inoltre, i due elementi che compongono il bioreattore utilizzato (parte inferiore e superiore) i quali una volta serrati, consento di fissare la cartuccia di silicone in cui è alloggiato il patch di tessuto (Figura 4.7).

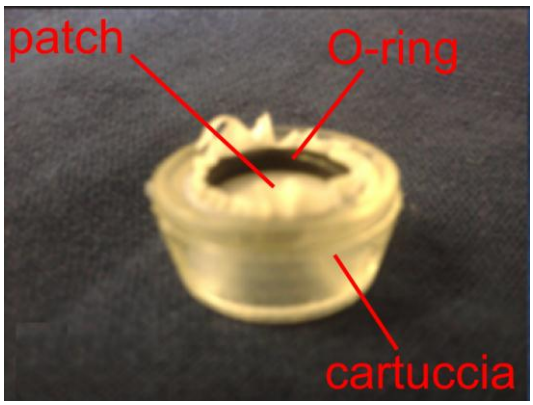


Figura 4.7 Cartuccia di PDMS in cui è alloggiato il patch di tessuto decellularizzato. Tramite una guarnizione in gomma siliconica (o-ring) il patch viene vincolato all'interno della cartuccia. La cartuccia viene poi inserita all'interno del bioreattore a perfusione impiegato nelle prova.

Ciascuno dei provini ricavati dalle porzioni di vescica decellularizzata è stato sollecitato con tre differenti valori di portata (Q, Eq. 3), pari a 10, 15, 20 µl/min.

La sollecitazione è stata applicata per una durata di tempo variabile in funzione del segnale di pressione acquisito. Obiettivo della prova è, infatti, quello di giungere ad un plateau del segnale di pressione registrato durante l'infusione ed utilizzare questo valore nel calcolo del ΔP nell'Eq. 3. Il tempo di infusione, variabile rispetto ai 3 valori di portata utilizzati, è inoltre caratterizzato da un certo grado di variabilità tra i differenti campioni. Nel corso delle diverse prove condotte, si è comunque limitata la durata della sollecitazione ad un massimo di 2 ore, per non giungere a deterioramento del tessuto, come suggerito anche dalla letteratura [33, 34], e falsare dunque la prova.

Il raggiungimento di un plateau della pressione, in risposta ad una continua infusione di fluido, è rappresentativo del raggiungimento della condizione di equilibrio del fenomeno della filtrazione (fine del transitorio), ovvero la condizione in cui si ha l'uguaglianza tra il volume di fluido infuso dalla pompa e quello che filtra attraverso le pareti del patch. Se il tessuto fosse totalmente impermeabile questa condizione non si verificherebbe mai: infatti nel caso delle prove condotte con il tessuto urovescicale nativo (si veda la sezione dei risultati della prova, 4.3.2) si è osservato un continuo incremento della pressione a cavallo del patch, indice del fatto che il tessuto ha un coefficiente di permeabilità prossimo allo zero. Nel caso del tessuto decellularizzato invece il coefficiente di permeabilità non è nullo a causa del processo di decellularizzazione che, come detto in precedenza, elimina la componente cellulare uroteliale e causa un aumento della porosità della matrice extracellulare.

Nel corso di questa campagna di prove condotta con il sistema di controllo sviluppato sono stati testati 8 provini ricavati da 5 campioni di tessuto urovescicale decellularizzato.

4.3.2 Risultati sperimentali

In Tabella 4.1 vengono riportati i risultati delle prove effettuate. Sono stati tesati 5 provini di patch di vescica decellularizzata con protocollo dinamico (indicati con la lettera D) e 3 provini di patch di vescica decellularizzata con protocollo statico (indicati con la lettera S).

K [µl/min mmHg]

Q [µl/min] / ΔP [mmHg]	10	15	20
D1_1	4.2	20.1	40.3
D2_1	16.3	37.5	71.2
D2_2	10.2	26.4	51.6
D3_1	9.8	31.4	58.9
D3_2	4.5	18.3	38.9
S1_2	2.9	4.8	7.4
S2_1	2.1	2.9	3.7
S2_2	1.2	2	2.7

Tabella 4.1 Dati ottenuti dalle prove di permeabilità per i campioni testati. I campioni evidenziati in azzurro sono stati decellularizzati per protocollo dinamico (D), mentre quelli viola per protocollo statico (S).

I punti sperimentali di Tabella 4.1 sono stati poi interpolati in un grafico (Figura 4.8) così da evidenziare la relazione tra la portata imposta tramite la pompa (Q) e la corrispondente caduta di pressione (ΔP) registrata tramite il sensore di pressione.

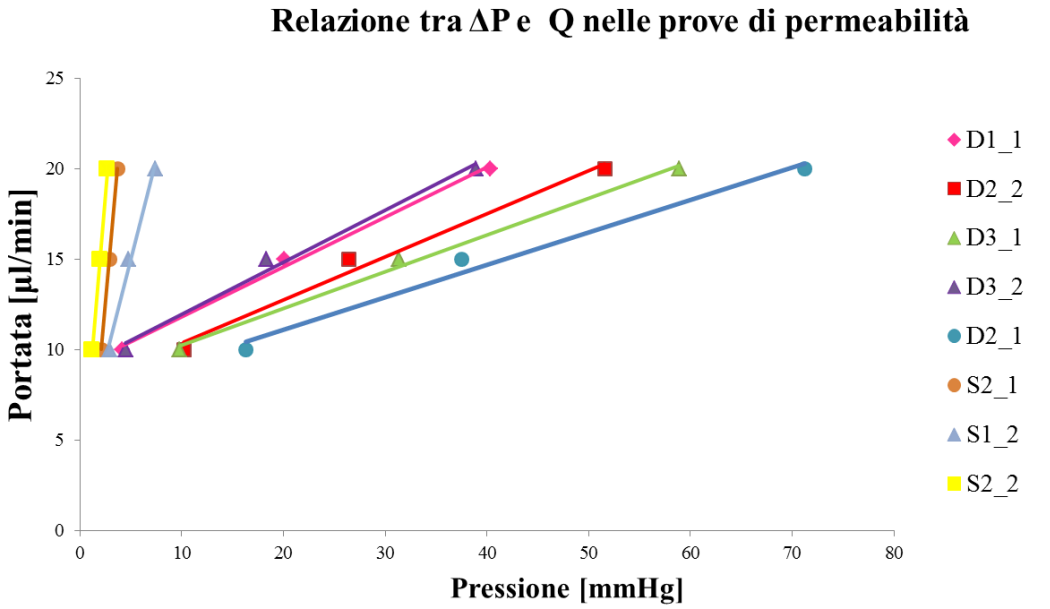


Figura 4.8 Curve P-Q ottenute in seguito a prove di permeabilità su tessuto di vescica decellularizzato con protocollo statico (S) e protocollo dinamico (D).

I punti sperimentali ricavati dalle diverse prove effettuate sono stati poi interpolati tramite retta di regressione (Figura 4.8) Si osserva che la relazione Q-ΔP è lineare, pertanto, è possibile utilizzare la relazione definita nell'equazione 3 per il calcolo del coefficiente di permeabilità K, calcolando il rapporto fra la portata di infusione imposta e la caduta di pressione misurata.

Per i 5 campioni decellularizzati con protocollo dinamico si è ricavato un valore di K_{medio} pari a: 0.239 ± 0.046 µl min^{-1} $mmHg^{-1}$ mentre per i provini decellularizzati con protocollo statico il K_{medio} è stato valutato pari a 5.037 ± 2.462 µl min^{-1} $mmHg^{-1}$. Il risultato ottenuto mostra come i patch di tessuto decellularizzato abbiano un coefficiente di permeabilità non nullo a differenza del tessuto nativo, sostanzialmente impermeabile, caratterizzato da un coefficiente di permeabilità pari a 0 [35]. In funzione dei risultati di carattere biologico ottenuti, si può quindi evincere che le prove di permeabilità rappresentano un'ulteriore conferma del fatto che, a seguito del processo di decellularizzazione, il tessuto urovescicale, inizialmente impermeabile, diventa fortemente permeabile a causa della rimozione delle cellule uroteliali e dell'aumentata porosità della matrice, che favorisce la filtrazione del fluido attraverso le sue pareti. D'altro canto, la completa rimozione della componente cellulare dal tessuto è un aspetto imprescindibile per l'ottenimento di un patch impiantabile *in vivo* nell'uomo (paragrafo 1.1.1). Pertanto, in previsione di un suo futuro impiego per interventi di cistoplastica si renderà necessario procedere alla ricellularizzazione (ad esempio tramite cellule uroteliali o co-cultura di cellule uroteliali e cellule muscolari) del tessuto, al fine di ridurne la permeabilità.

Si deve però notare come il valore di K_{medio} dei campioni decellularizzati con protocollo dinamico sia inferiore di oltre un ordine di grandezza rispetto al K_{medio} dei campioni decellularizzati con protocollo statico e molto più vicino, inoltre, al valore del tessuto nativo (0). Il valore inferiore di K dei campioni decellularizzati per via dinamica è indice di un grado di porosità minore rispetto ai campioni decellularizzati per via statica. Questo è spiegabile considerando che il protocollo dinamico riesce a preservare meglio le caratteristiche strutturali dell'ECM dell'organo (pur garantendo una effettiva rimozione cellulare). Tale effetto appare evidente analizzando le istologie dei campioni di vescica decellularizzati con protocollo statico e/o dinamico e confrontati con il tessuto nativo (Figura 4.9).

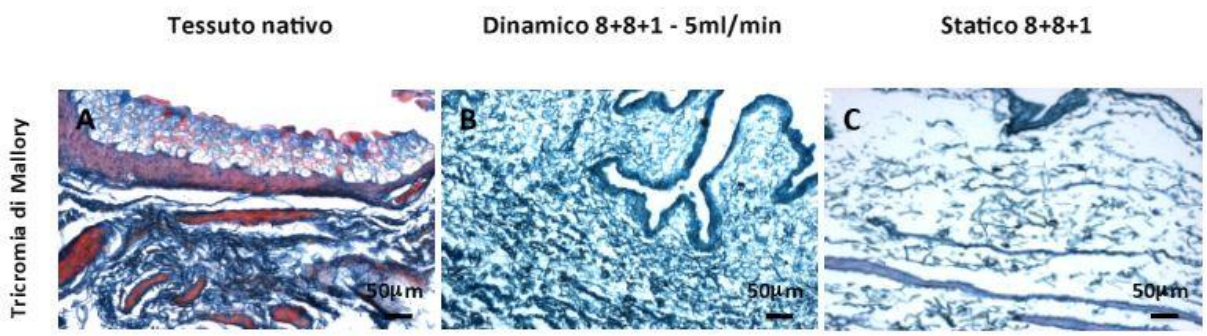


Figura 4.9 Istologie ottenute con colorazione tricromica di Mallory rispettivamente per il tessuto nativo (sinistra), il tessuto decellularizzato per via dinamica (centro) e il tessuto incubato staticamente (destra).

Dalle immagini istologiche di Figura 4.9 appare chiaro come il protocollo dinamico sia più efficace nel mantenimento dell'organizzazione delle fibre di collagene che appaiono più impaccate, come si osserva nel caso del tessuto nativo, rispetto al caso statico. Ciò è spiegabile dal fatto che fisiologicamente la vescica è un organo non votato ad accumulare grandi volumi di urina al suo interno per lunghi intervalli di tempo come nel caso del protocollo statico. Sotto queste condizioni la vescica subisce sollecitazioni non fisiologiche, che causano una maggiore degradazione dei fasci di fibre di collagene.

I coefficienti di permeabilità ricavati sono stati poi confrontati con i dati presenti in letteratura. In particolare nei lavori di *Farhat et al.* [34] e di *Cartwright et al.* [33], è stato analizzato il coefficiente di permeabilità della matrice decellularizzata di vescica porcina. In entrambi i lavori è stato impiegato un protocollo statico di decellularizzazione per l'ottenimento della matrice su cui è stato effettuato il test di misura della permeabilità. Il protocollo di prova utilizzato per la misura di permeabilità è basato sull'imposizione di una pressione idrostatica costante (colonna di acqua), pari a 10 cmH_2O, che va ad agire sul campione ed è stato misurato, a istanti di tempo definiti (ogni ora per tre ore), il volume ultra filtrato a valle del campione. I valori trovati sono pari rispettivamente a 9 $\mu l\ min^{-1}\ mmHg^{-1}$ [33] e 68 $\mu l\ min^{-1}\ mmHg^{-1}$ [34] quindi paragonabili, in particolare nel caso del lavoro di *Farhat* [34] al valore di K_{medio} (5.0371 $\mu l\ min^{-1}\ mmHg^{-}1$) dei provini decellularizzati con protocollo statico, determinato nel presente lavoro di tesi.

In relazione all'utilizzo nelle prove effettuate, l'impiego del SW di controllo oltre a permettere un controllo accurato sulla portata, ha consentito di monitorare in tempo reale e registrare i dati di pressione e volume rispetto al protocollo precedente, dove il valore di pressione è stato registrato manualmente ad intervalli di 30 minuti. In Figura 4.10 si mostra il grafico della pressione rispetto al tempo che l'utente visualizza, in tempo reale, attraverso l'interfaccia grafica del SW.

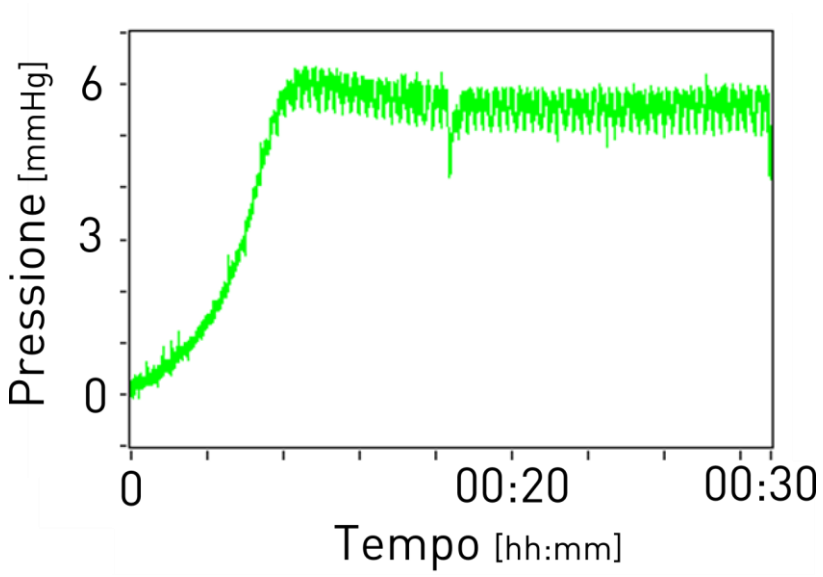


Figura 4.10 Grafico P(t) dell'interfaccia utente del SW di controllo.

Il monitoraggio in tempo reale della pressione consente all'utente di identificare con esattezza il momento in cui il valore di pressione giunge a plateau: nel caso mostrato in Figura 4.10, dopo circa 20 minuti dall'inizio della prova. Nel caso in cui il valore di pressione monitorato arrivi a plateau in un tempo inferiore alle due ore, l'utente può verificarlo in temo reale tramite il pannello grafico della pressione in funzione del tempo e bloccare la prova. Ciò permette di sollecitare per un tempo minore il patch così da preservare maggiormente il tessuto per eventuali prove successive e di ridurre il tempo della prova consentendo di condurre campagne su un numero di campioni maggiore in un tempo minore rispetto al set up precedentemente utilizzato. Inoltre l'impiego del sistema di controllo rende la prova più automatizzata, limitando l'intervento dell'utente alle fasi di preparazione del set up e alloggiamento del campione nel bioreattore a perfusione.

4.4 Prove di cistometria su vescica

Il terzo test che è stato condotto utilizzando il sistema di controllo è volto a valutare la variazione delle proprietà meccaniche dell'organo intero di vescica (modello animale del coniglio) a valle del processo di decellularizzazione (i dettagli del processo sono riportati nel paragrafo 4.5). Quest'analisi è necessaria in ottica del successivo impiego del tessuto decellularizzato nella rigenerazione di organi. Infatti, per poter impiegare il tessuto o organo decellularizzato come supporto per ricreare organi *in vitro*, occorre valutare se il tessuto, a seguito di un processo di

decellularizzazione, abbia mantenuto caratteristiche biomeccaniche comparabili con quelle del tessuto/organo nativo.

Nel dettaglio, l'analisi della caratteristica biomeccanica descritta nel presente paragrafo è definita come prova di cistometria. Il test di cistometria consente di valutare la risposta dell'organo intero di vescica dal punto di vista dell'incremento di pressione intravescicale associata ad un incremento del volume intravescicale, ovvero associata ad un riempimento dell'organo con un fluido in pressione. In ambito clinico la cistometria è un test funzionale utilizzato per diagnosticare eventuali patologie dell'organo legate a disfunzioni del processo di immagazzinamento dell'urina e della successiva minzione (problemi di minzione, incontinenza, ritenzione urinaria, infezioni del tratto urinario, ecc...).
Nell'ambito della caratterizzazione del comportamento biomeccanico della vescica decellularizzata, il test è volto a valutare le proprietà di distensibilità, ovvero la compliance dell'organo. Pertanto è possibile definire la capacità dell'organo, ovvero il massimo volume di fluido che la vescica è in grado di immagazzinare prima di giungere ad una condizione cosiddetta di *overstretching* Questa condizione è caratterizzata da una sovrasollecitazione meccanica delle componenti strutturali della matrice dell'organo, che potrebbero portare ad un danneggiamento delle strutture e conseguentemente ad una perdita di funzionalità dal punto di vista biomeccanico. La peculiare proprietà della vescica di rispondere con un moderato incremento della pressione in risposta all'immagazzinamento di grandi volumi di fluido (fino al valore di *overstretch*) è infatti una proprietà mediata anche dalle proprietà meccaniche del tessuto.
Il test realizzato ha previsto quindi l'infusione (tramite una pompa comandata dal SW del sistema di controllo) di un fluido all'interno dell'organo incannulato e il monitoraggio dell'incremento di pressione (acquisito tramite un sensore di pressione) ad esso associato.
Inoltre l'analisi della curva di cistometria (curva della relazione pressione-volume intravescicale, P-V) dell'organo effettuata sull'organo nativo, ovvero prima della decellularizzazione, consente di estrarre alcuni parametri che verranno poi utilizzati nel protocollo di decellularizzazione dell'organo intero, come sarà descritto nel paragrafo 4.5.2.

Il test cistometrico consente quindi di costruire la curva P-V di cui in Figura 4.11 è mostrato l'andamento tipico per la vescica nativa.

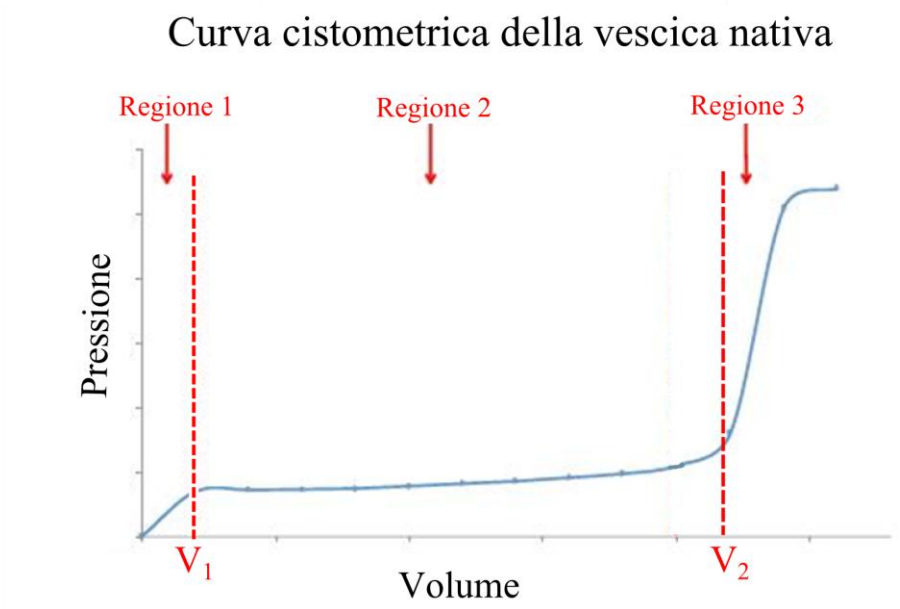


Figura 4.11 Curva P-V di una vescica nativa: sono evidenziate le tre regioni caratteristiche della curva in funzione di due specifici valori di volume intravescicale (V_1 e V_2).

Analizzando la curva in Figura 4.11 è possibile distinguere tre diverse regioni:

i. regione 1: si osserva un repentino incremento della pressione intravescicale a seguito dell'infusione di limitati volumi di fluido ($V < V_1$);
ii. regione 2: si osserva un moderato incremento della pressione a fronte di un consistente aumento del volume infuso all'interno dell'organo ($V_1 < V < V_2$);
iii. regione 3: continuando ad infondere volume oltre il valore V_2 si osserva un brusco e significativo incremento del valore di pressione, per limitati incrementi del volume infuso.

Il range fisiologico di sollecitazione della vescica si limita alle prime due regioni. In particolare, si può definire V_2 come il valore corrispondente alla capacità della vescica, oltre il quale si giunge nella regione (comportamento non fisiologico) di *overstretching*. Tale regione della curva fa riferimento ad un comportamento non osservabile *in vivo* in quanto non fisiologico. Infatti, *in vivo*, superato il valore V_2, la contrazione delle cellule muscolari (in risposta ad uno stimolo che giunge dal sistema nervoso) attiva il meccanismo della minzione con conseguente svuotamento dell'organo. La curva di Figura 4.11 è stata invece ottenuta incannulando la vescica e infondendo il fluido attraverso l'uretra e, al fine di impedire appunto lo svuotamento, avendo preventivamente suturato gli ureteri (si veda la descrizione del protocollo del test riportato nel paragrafo 4.5.2).

4.4.1 Protocollo di prova

Le prove di cistometria sono state effettuate su due vesciche espiantate da conigli bianchi maschi di 6 mesi di vita, prelevati dal macello. Presso il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Milano, un'equipe di veterinari ha provveduto all'espianto degli organi dai due animali. La prima vescica è stata testata dopo circa 4 ore dall'espianto, mentre la seconda è stata conservata in PBS a 4°C fino al momento della prova (circa 96h) per evitare la degradazione del tessuto.

L'infusione del fluido (acqua bi-distillata) all'interno dell'organo avviene attraverso l'uretra, incannulata tramite un apposito catetere (la vescica viene fissata tramite una fascetta in plastica al catetere all'altezza dell'uretra) (Figura 4.12) e gli ureteri vengono suturati (filo da sutura chirurgico) per evitare che vi sia la fuoriuscita del liquido infuso all'esterno dell'organo durante la prova. Questa operazione garantisce quindi la tenuta idraulica dell'organo in risposta all'infusione del fluido al suo interno. Durante l'infusione, la vescica viene immersa all'interno di un beaker contenente acqua bi-distillata.

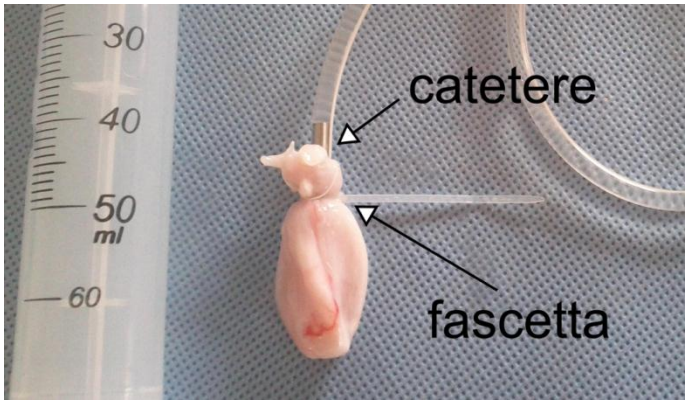


Figura 4.12 Vescica nativa di coniglio incannulata attraverso l'uretra e fissata tramite una fascetta al catetere.

Il set up realizzato per le prove di cistometria prevede l'impiego di:

- una pompa peristaltica (IPC-N12, Ismatec) utilizzata per il riempimento del lume interno della vescica;
- un sensore di pressione (26PCA, Honeywell) ed il suo circuito di amplificazione, per monitorare il valore di pressione intravescicale in tempo reale durante l'infusione;
- un PC con il SW di controllo sviluppato (controllo dell'attuatore idraulico e monitoraggio del sensore);
- una scheda NI DAQ USB-6211 ed i relativi cablaggi per interfacciare l'hardware del set up al PC (illustrati nel capitolo 2).

Durante le prove sperimentali è stato allestito un solo set up sia per le prove di cistometria che per le prove di decellularizzazione dell'organo. Per maggiore chiarezza, in Figura 4.13 è mostrato il set up con i componenti necessari alla sola prova di cistometria, privato quindi dell'elettrovalvola impiegata nella prova di decellularizzazione (il set up completo sarà descritto nel paragrafo 4.5.1).

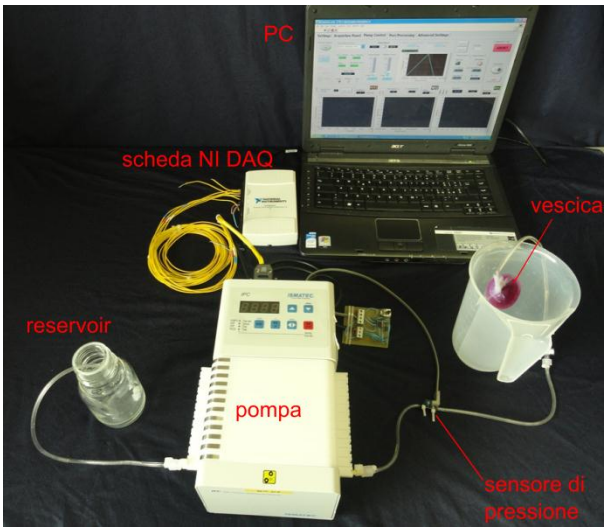


Figura 4.13 Set up per la prova di cistometria pre e post decellularizzazione della vescica. Sono visibili: PC con il SW di controllo, scheda NI DAQ, pompa volumetrica, sensore di pressione, contenitore con la vescica.

Attraverso il set up di Figura 4.13 è stato quindi possibile procedere, anche in questo caso senza richiedere alcun intervento manuale da parte dell'operatore, con il riempimento dell'organo tramite l'infusione di fluido (acqua bidistillata) monitorando tramite il SW di controllo sia il volume infuso che la pressione, in tempo reale. La portata di riempimento è pari a 1 ml/min.
Con riferimento alla Figura 4.13, la pompa quindi preleva il fluido da un reservoir posto a monte della pompa stessa e lo infonde all'interno dell'organo incannulato e collegato al circuito idraulico. Tra la pompa e l'organo è posto il sensore di pressione per l'acquisizione del valore di pressione intravescicale.

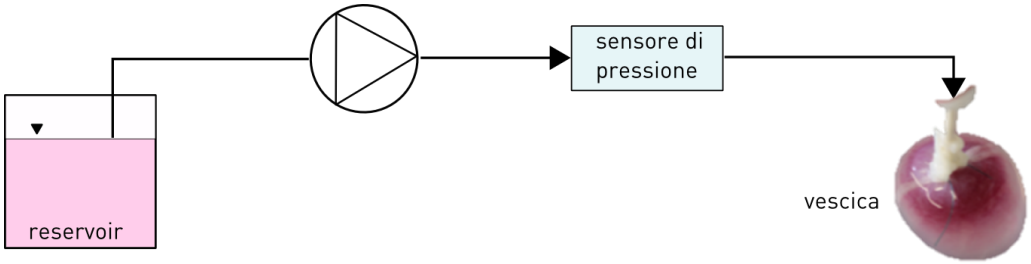


Figura 4.14 Circuito idraulico del set up per la prova di cistometria. Sono visibili: reservoir, pompa, sensore di pressione, vescica

4.4.2 Risultati sperimentali

La prova di cistometria è stata eseguita sia prima (vescica nativa, Cisto Pre) che dopo (vescica, decellularizzata, Cisto Post) il processo di decellularizzazione dell'organo in modo da valutare le eventuali variazioni delle proprietà meccaniche e, in particolare, del valore di compliance dell'organo. I risultati ottenuti dalle prove di cistometria effettuate sui due organi vengono analizzati separatamente (Campione #1, Campione #2).

Campione #1

Le curve di cistometria del campione #1 sono riportate in Figura 4.15.

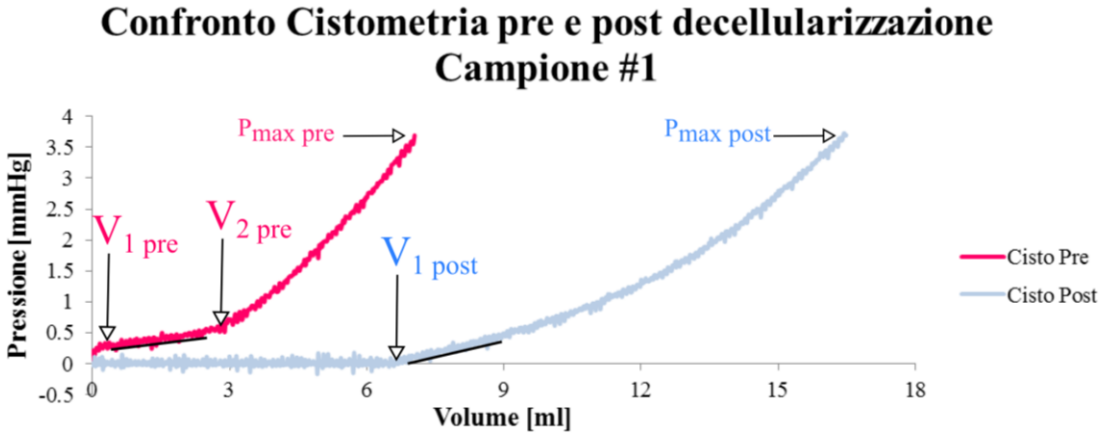


Figura 4.15 Confronto tra la curva P-V caratteristica dell'organo nativo (Cisto Pre) e dell'organo decellularizzato (Cisto Post) per il campione #1. Sono indicati i valori di $V_{1\ pre}$, $V_{2\ pre}$, $V_{1\ post}$, $P_{max\ pre}$, $P_{max\ post}$ e le rette che approssimano la zona lineare della curva P(V) in cui è stata calcolata la C.

Analizzando la curva si osserva innanzitutto come la curva P-V subisca delle notevoli modificazioni a valle del trattamento di decellularizzazione.

L'organo nativo (Cisto Pre) ha un comportamento simile a quello riportato in Figura 4.11. Si possono infatti distinguere le tre regioni delimitate dai valori di V_{1pre} e V_{2pre}. L'organo quindi risponde inizialmente ($V < V_{1pre}$) con un rapido seppur limitato incremento di pressione a fronte dell'iniziale infusione di volume. Segue poi una fase ($V_{1pre} < V < V_{2pre}$) in cui ad un sostanziale incremento di volume corrisponde un incremento di pressione molto limitato (range fisiologico dell'organo). L'ultima regione che si può evidenziare ($V > V_{2pre}$, in accordo con la Figura 4.15) è caratterizzata da un repentino incremento di pressione a seguito di un ridotto incremento di volume, che come detto fa riferimento ad una condizione non fisiologica.

Analizzando ora la curva dell'organo decellularizzato si osserva come il valore di $V_{1\ post}$ (6.5 ml) sia maggiore rispetto il valore di V_{1pre} (0.2 ml) di circa un fattore 30. Infatti, fino al valore di $V_{1\ post}$, vi è una regione in cui la vescica risponde ad elevati volumi infusi con un incremento di

pressione sostanzialmente nullo. Questo fenomeno è dovuto al processo di decellularizzazione che, oltre ad eliminare la componente cellulare, provoca una modificazione parziale nell'organizzazione e nella distribuzione delle proteine strutturali di membrana (principalmente collagene). Va però osservato come, oltre il valore di V_{1post}, il campione decellularizzato risponda a successivi incrementi di volume con un effettivo incremento di pressione. In particolare, si può osservare come l'organo post decellularizzazione sia in grado di raggiungere un valore di pressione (P_{max_post} in Figura 4.15, pari a circa 4 mmHg) equivalente a quello registrato per il campione nativo.

Dall'analisi della curva P-V in Figura 4.15 è possibile stimare il valore della compliance (C) dell'organo pre e post decellularizzazione. È stata calcolata la compliance nel tratto di curva successivo al valore V_1 sia per la curva pre decellularizzazione che post decellularizzazione. Tale valore equivale all'inverso della pendenza del tratto lineare della curva P-V successivo al valore V_1 (rette in Figura 4.15), come descritto nell'Eq. 1 del paragrafo 4.2.1. Si è quindi osservato che la vescica nativa è caratterizzata da un valore di C pari a circa 8.69 ml/mmHg, mentre l'organo decellularizzato presenta un valore di C pari a circa 5.25 ml/mmHg, che si traduce quindi in una diminuzione del valore di C di un fattore 1.7 rispetto all'organo nativo.

Quinidi, nonostante l'organo decellularizzato sia ancora in grado di rispondere con un incremento di pressione intravescicale paragonabile al caso dell'organo nativo (P_{max} comparabile) in risposta ad un riempimento, le sue proprietà meccaniche sono state, seppur in maniera contenuta, alterate dall'azione degli agenti decellularizzanti (V_1 e C differenti tra organo nativo e decellularizzato).

Campione #2

Le curve di cistometria del campione #2 sono riportate in Figura 4.16.

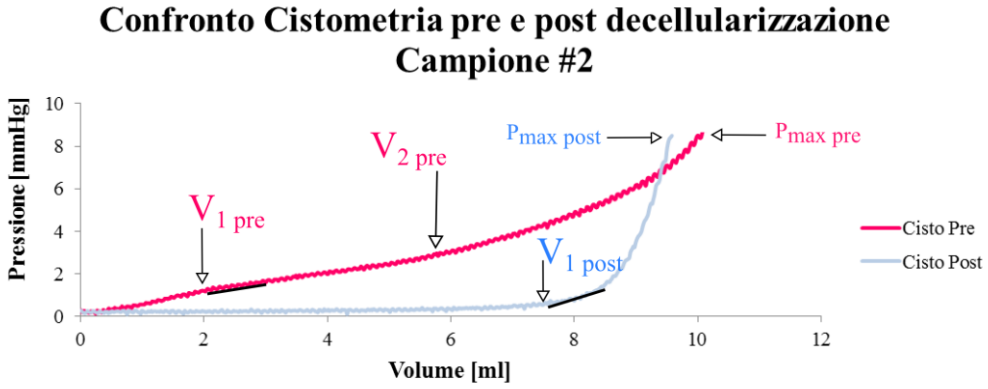


Figura 4.16 Confronto tra la curva P-V caratteristica dell'organo nativo (Cisto Pre) e dell'organo decellularizzato (Cisto Post) per il campione #2. Sono indicati i valori di $V_{1\ pre}$, $V_{2\ pre}$, $V_{1\ post}$, $P_{max\ pre}$, $P_{max\ post}$ e le rette che approssimano la zona lineare della curva P(V) in cui è stata calcolata la C.

Per l'organo nativo, si possono distinguere le tre regioni descritte nel paragrafo 4.4. In particolare si osserva il valore di $V_{1\ pre}$ pari a 2 ml e il valore di $V_{2\ pre}$ circa di 6 ml.
Analogamente al campione #1, il valore di V_1 per il campione #2 pre e post decellularizzazione è molto diverso. Prima della decellularizzazione, infatti, il valore di $V_{1\ pre}$ è pari a circa 2 ml, mentre a seguito del processo di decellularizzazione, il valore di $V_{1\ post}$ è pari a circa 7 ml. Anche in questo caso quindi si può osservare come l'organo decellularizzato debba essere pre-riempito con un volume di fluido (7 ml) maggiore rispetto al caso dell'organo nativo per poter rispondere con un incremento di pressione significativo ($V > V_{1\ post}$, in Figura 4.16).
Anche in questo caso il campione #2 ha raggiunto il valore di pressione massima a cui è stato sollecitato in questa prova (P_{max} pari a 9 mmHg in) sia prima che dopo il processo di decellularizzazione.
È stato calcolato il valore di compliance dell'organo nativo e decellularizzato sempre nel tratto di curva successivo al valore di V_1 (rette in Figura 4.16) stimando per l'organo nativo un valore di C di 2.35 ml/mmHg e per la vescica decellularizzata di 1.26 ml/mmHg. La vescica decellularizzata mostra quindi un valore di compliance diminuito di un fattore 1.9 rispetto all'organo nativo.

Le prove di cistometria su vescica sono state condotte avvalendosi del SW del sistema di controllo realizzato ed in particolare sfruttando la modalità manuale in controllo di volume.
Monitorando i pannelli grafici che mostrano l'andamento del volume infuso e della pressione intravescicale e, soprattutto, grazie al grafico integrato della pressione in funzione del volume, l'utente riesce a sollecitare l'organo entro il suo range fisiologico durante la cistometria, fermando quindi la prova non appena si supera il valore di V_2. In questo modo non si rischia di danneggia l'ECM dell'organo prima della decellularizzazione, conseguenza invece possibile nelle prove di cistometria che non consentono di visualizzare la curva P-V in tempo reale.
Sempre grazie l'integrazione nel SW di controllo dei pannelli grafici che mostrano l'andamento della pressione in funzione del volume, l'utente può monitorare in tempo reale l'output della prova e, qualora necessario, correggere alcuni parametri impostati precedentemente, quali il valore della portata di infusione, nel caso in cui si accorgesse che questi ultimi non sono adatti allo specifico organo testato. Infatti, il valore di portata di infusione impostato (1 ml/min) è stato scelto sulla base di precedenti prove effettuate dai ricercatori del μBS Lab ma, è stimato sulla base di un'analisi statistica effettuata su un certo numero di organi. Ovviamente però, a causa

dell'intrinseca variabilità di comportamento tra differenti campioni biologici, questo valore potrebbe non essere il più adeguato per tutti gli organi. In questo caso quindi, l'utilizzo del SW di controllo, ed in particolare la possibilità di monitorare l'output delle prove in tempo reale, consente di definire un protocollo di prova specifico per ciascun campione. Nel caso della cistometria pre decellularizzazione il monitoraggio della stimolazione tramite il SW ha inoltre permesso di valutare il range di pressioni entro cui sollecitare l'organo durante il processo di decellularizzazione per mantenere la stimolazione in un range di pressioni fisiologico ($V < V_2$ in Figura 4.11).

4.5 Prove di decellularizzazione della vescica

Come anticipato nel paragrafo 1.1.1, dall'analisi della letteratura è emerso come le matrici decellularizzate ottenute da tessuti/organi biologici rappresentino, tra le varie tipologie di scaffold utilizzati in ingegneria dei tessuti, quelle che dimostrano i risultati più promettenti dal punto di vista della possibilità di ottenere un tessuto/organo in grado di replicare le funzioni del tessuto/organo nativo patologico da rigenerare. Tra i diversi vantaggi che risiedono nell'utilizzo di una matrice biologica decellularizzata, di notevole rilevanza è il fatto che tale matrice possegga proprietà meccaniche paragonabili al tessuto nativo che si vuole rigenerare. Inoltre, le matrici decellularizzate non provocano fenomeni indesiderati post impianto nel paziente come i problemi legati al trapianto di organo, quali il rigetto da parte dell'organismo ricevente. Allo stesso tempo, nelle matrici biologiche decellularizzate vengono conservate le componenti proteiche della ECM in grado di favorire l'adesione, la colonizzazione e la proliferazione cellulare e quindi l'integrazione con i tessuti/organi su cui vengono impiantate all'interno dell'organismo.

Sulla base di queste evidenze sperimentali, inserendosi all'interno di un progetto di ricerca ad oggi in corso presso il µBS Lab, svolto in collaborazione con il personale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università Statale degli Studi di Milano, nel presente lavoro di tesi si è proceduto ad integrare il sistema di controllo in un set up sperimentale volto alla decellularizzazione di un organo intero, nello specifico, la vescica del modello animale del coniglio [36]. In applicazioni di medicina rigenerativa della vescica, la matrice di vescica decellularizzata (bladder acellular matrix, BAM) si è dimostrata essere una valida alternativa come sostituto di porzioni di tessuto nativo affetto da patologia rispetto alle tecniche di medicina tradizionale. L'aspetto più innovativo del protocollo proposto per la decellularizzazione dell'organo intero è l'utilizzo di un sistema che consente di realizzare una decellularizzazione

dinamica della vescica, basata su un protocollo di decellularizzazione chimico-fisico che consiste nell'applicazione di cicli ripetuti di infusione all'interno dell'organo e successiva aspirazione delle soluzioni contenenti gli agenti decellularizzanti. Tale approccio non è innovativo rispetto i metodi ad oggi presentati in letteratura: la maggior parte dei protocolli di decellularizzazione della vescica è basato, infatti, sulla incubazione (statica) dell'organo, ovvero l'immersione della vescica all'interno delle soluzioni decellularizzanti [38, 39].

La natura dinamica del processo (cicli di infusione/aspirazione) rende quindi questo protocollo particolarmente adatto ad essere gestito tramite il sistema di controllo sviluppato nel presente lavoro di tesi che consente il controllo degli attuatori ed il continuo monitoraggio dei parametri caratteristici del processo, quali la portata da infondere/aspirare, il volume di fluido da infondere o la pressione raggiunta all'interno dell'organo durante l'infusione delle soluzioni.

4.5.1 Set up per la decellularizzazione della vescica

Il set up sperimentale per la decellularizzazione dinamica della vescica, progettato e realizzato nell'ambito delle attività del presente progetto di tesi, è mostrato in Figura 4.17.

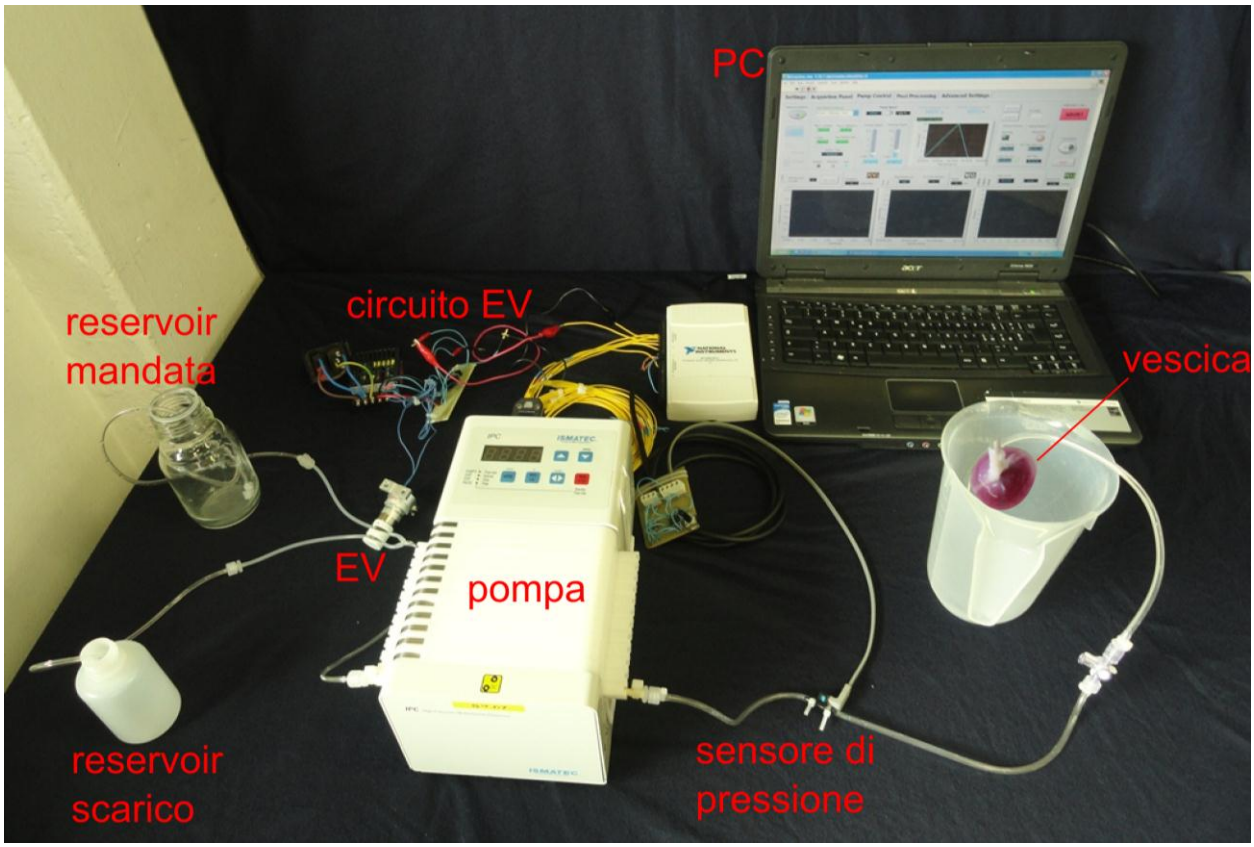


Figura 4.17 Set up per la decellularizzazione di organo intero (vescica). Sono visibili: PC con il SW di controllo, pompa volumetrica, sensore di pressione, contenitore con la vescica, reservoir con le soluzioni decellularizzanti, reservoir di scarico, elettrovalvola pinza tubo (EV), circuito elettrovalvola.

Il set up è composto da:

- una pompa peristaltica (IPC-N12, Ismatec) utilizzata per l'infusione delle soluzioni contenenti gli agenti decellularizzanti all'interno della vescica incannulata;
- un sensore di pressione (26PCA, Honeyweel) ed il suo circuito di amplificazione per monitorare il valore di pressione all'interno dell'organo, in tempo reale;
- un'elettrovalvola pinza tubo (075P3MP12-02S, Bio-ChemFluidics) per canalizzare il flusso della soluzione decellularizzante nei due rami (linea di infusione e linea di scarico) del circuito idraulico durante il processo di decellularizzazione;
- il circuito di alimentazione e di sincronizzazione dello switch dell'elettrovalvola con i segnali inviati tramite SW;
- un PC su cui viene eseguito il SW di controllo;

Lo schema del circuito idraulico del set up per la decellularizzazione è mostrato in Figura 4.18.

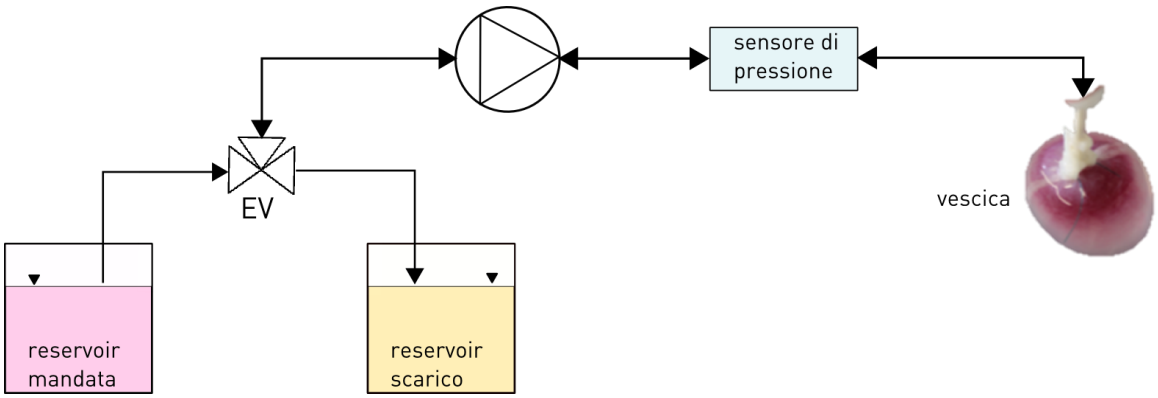


Figura 4.18 Circuito idraulico del set up per la decellularizzazione di vescica. Sono visibili: reservoir di mandata, reservoir di scarico, elettrovalvola a tre vie (EV), pompa, sensore di pressione, vescica

La componente HW del sistema di controllo realizzato, come anticipato nel paragrafo 2.2.3, integra anche un'elettrovalvola pinza tubo a tre vie (EV). L'EV viene utilizzata per abilitare alternativamente uno dei due rami che compongono il circuito idraulico: una linea del circuito (linea di infusione) serve a permettere l'infusione delle soluzioni decellularizzanti all'interno della vescica prelevate dalla pompa dal reservoir di mandata; l'altro ramo (linea di scarico) consente invece la raccolta nel reservoir di scarico delle soluzioni aspirate, sempre tramite la pompa, dall'interno dell'organo. I due rami sono attivi a fasi alterne e ciclicamente abilitati/disabilitati in accordo con l'alternarsi ciclico delle fasi di infusione e di aspirazione. La commutazione dell'EV, gestita dal SW di controllo, viene effettuata in maniera sincrona con il passaggio dalla fase di infusione a quella di aspirazione. Nel dettaglio, quando è attiva la fase di

infusione, l'EV apre esclusivamente la linea di infusione mentre quando si è invece in fase di aspirazione, l'EV commuta chiudendo il ramo del circuito di infusione e aprendo la linea di scarico. L'infusione e l'aspirazione delle soluzioni decellularizzanti è, come detto, gestita dalla pompa il quale riceve dal SW il comando di inversione del senso di rotazione dei rulli.

4.5.2 Protocollo di prova

Il protocollo che si è dimostrato più efficace tra quelli presi in considerazione durante le campagne sperimentali precedentemente svolte presso il µBS Lab [36], combina una decellularizzazione basata su trattamento chimico (azione di rimozione cellulare per azione chimica dei detergenti) con un approccio di tipo fisico, realizzato tramite il continuo riempimento dell'organo con gli agenti decellularizzanti e la successiva aspirazione degli agenti stessi. Tale approccio ha tre obiettivi principali: i) distendere la superficie della parete della vescica così che essa sia interamente esposta all'azione degli agenti decellularizzanti, ii) facilitare la penetrazione degli agenti decellularizzanti in profondità nelle regioni più interne della parete della vescica, grazie al contributo fornito dal gradiente di pressione imposto all'interno dell'organo durante l'infusione; iii) facilitare la rimozione dei detriti cellulari attraverso i continui lavaggi interni dell'organo, risultanti dai cicli di aspirazione.

Lo stimolo chimico è volto alla rimozione delle componenti cellulari attraverso esposizione dell'organo all'azione di 2 differenti soluzioni decellularizzanti:

- soluzione ipotonica: acqua deionizzata utilizzata per la lisi della membrana cellulare per effetto osmotico (la cellula tende ad assorbire l'acqua deionizzata fino alla rottura della sua membrana);
- detergente non ionico: 1% Triton-X 100 e 0.1% NH_4OH (Sigma-Aldrich), in grado di rimuovere selettivamente i residui/frammenti cellulari all'interno della matrice del tessuto.

Il protocollo di decellularizzazione dinamica prevede dunque l'infusione dell'organo con le due soluzioni, ha una durata complessiva di 17 ore ed è suddiviso in tre fasi:

i. cicli di infusione/aspirazione con acqua deionizzata della durata complessiva di 8 ore;
ii. cicli di infusione/aspirazione con Triton X-100 e NH_4OH; anche questa fase del protocollo ha una durata pari ad 8 ore;
iii. lavaggio finale attraverso cicli di infusione/aspirazione con acqua deionizzata volto a rimuovere gli eventuali residui cellulari e soluzioni detergenti rimasti all'interno dell'organo, per una durata complessiva di 1 ora.

Inoltre, l'esecuzione di continui cicli di infusione/aspirazione delle soluzioni decellularizzanti è volto a replicare la naturale dinamica di riempimento e svuotamento dell'organo *in vivo*. Per permettere l'infusione/aspirazione delle soluzioni nel/dall'organo la vescica viene incannulata con un catetere inserito nell'uretra al quale la vescica viene fissata tramite una fascetta in plastica, in analogia con quanto descritto nel paragrafo 4.4.1. e gli ureteri suturati per evitare la fuoriuscita delle soluzioni infuse nel lume interno dell'organo. L'organo viene poi immerso in un reservoir riempito della stessa soluzione decellularizzante che viene infusa/aspirata ciclicamente, per esporre anche la superficie esterna dell'organo all'azione degli agenti chimici.

Il protocollo precedentemente utilizzato prevede di infondere l'organo con una portata di infusione di 5 ml/min per 4 minuti, infondendo quindi 20 ml di soluzione decellularizzante. Al termine di questa fase si procede a svuotare l'organo per gravità (differenza di quota tra il reservoir di mandata e quello di scarico); queste due fasi vengono iterativamente ripetute per tutta la durata del processo di decellularizzazione (17 ore). I parametri scelti per la decellularizzazione ed in particolare il volume infuso ad ogni ciclo (20 ml), sono stati settati sulla base di prove di cistometria effettuate su diversi campioni di vesciche native. In particolare, si è stimato su base statistica che 20 ml fosse il volume limite di capacità (overstretching) dell'organo così da mantenere la vescica nella zona della curva P-V di comportamento fisiologico (Figura 4.11). Il protocollo quindi è basato sul controllo del volume infuso e, indipendentemente dallo specifico organo processato, prevede di infondere sempre lo stesso volume di fluido, assumendo cioè che questo sia sempre inferiore alla capacità massima dell'organo. La variabilità intrinseca nei differenti campioni biologici (in particolare la differente taglia dell'animale e la conseguente differente dimensione dell'organo) però non garantisce che questa condizione sia sempre rispettata. In particolare, tale variabilità può portare a generare nell'organo di dimensioni ridotte una sollecitazione meccanica che può danneggiare il tessuto dal punto di vista strutturale, compromettendone le sue proprietà meccaniche.

Nell'ambito del presente lavoro di tesi si è pertanto deciso di impostare un protocollo di decellularizzazione dinamica in controllo di volume ma limitato in pressione, cioè che garantisse la sollecitazione dell'organo entro un range di pressione definito dall'utente. Nel dettaglio, nel protocollo modificato nell'ambito del presente lavoro di tesi, la vescica viene riempita fino al raggiungimento di un valore soglia di pressione intravescicale (P_{max}) tale da infondere nell'organo un volume di soluzione decellularizzante sempre inferiore al volume di *overstretching*. Il valore di pressione soglia viene determinato specificatamente per ciascun organo processato attraverso un test di cistometria pre decellularizzazione (paragrafo 4.4). Inoltre, si è modificato il metodo utilizzato per lo svuotamento dell'organo, gestito, nel nuovo

protocollo, tramite il SW che invia alla pompa il segnale di inversione del verso di rotazione dei rulli: in questa configurazione, la aspirazione (svuotamento dell'organo) viene interrotta nel momento in cui il sensore rileva il raggiungimento, all'interno dell'organo, di un valore di pressione (P_{min}) pari a zero.

Tali modifiche del protocollo sono state possibili proprio grazie all'integrazione del sistema di controllo il quale: i) consente di monitorare in tempo reale il valore della pressione nell'organo, ii) consente di sincronizzare il passaggio dalla fase di infusione a quella di aspirazione sulla base del valore di pressione rilevato dal sensore (modalità limitazione in pressione) e iii) consente di sincronizzare la commutazione dell'EV, e quindi abilitare la linea di infusione o la linea di scarico, con l'istante del passaggio tra la fase di aspirazione e quella di infusione. Impostando la stimolazione via SW in limitazione di pressione possiamo quindi fissare il range di pressioni entro cui effettuare la decellularizzazione: il controllo del processo non è più quindi basato su un valore di volume infuso teorico ma su un valore di pressione rilevato in tempo reale tramite il SW e specifico per il campione processato.

4.5.3 Risultati sperimentali

Sono state effettuate due differenti prove di decellularizzazione con il nuovo protocollo, mantenendo inalterata la durata complessiva del processo (17ore) e delle 3 fasi (8+8+1 ore, paragrafo 1.1.2) e le soluzioni decellularizzanti (acqua deionizzata e 1% Triton X-100+0.1% NH_4OH).

Per ciascun campione si è proceduto ad effettuare la prova di cistometria pre-decellularizzazione: le curve P-V registrate sono riportata in Figura 4.19.

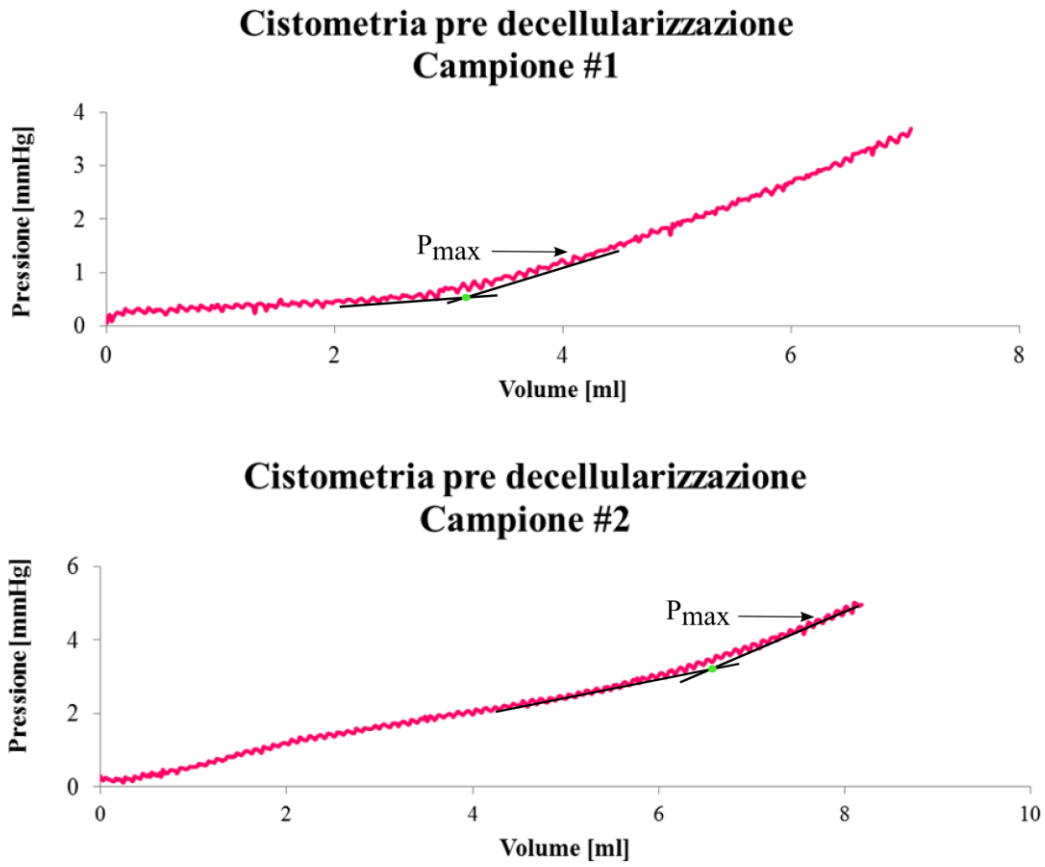


Figura 4.19 Curve P-V pre decellularizzazione del campione #1 e del campione #2. P_{max} rappresenta il valore di soglia massima settato per la prova di decellularizzazione. Il puntino verde rappresenta il valore di P corrispondente al volume V_2 di transizione.

Sulla base delle curve P-V acquisite per ciascun organo, si sono impostati i seguenti valori di pressione di soglia specifici per i due organi, definendo i seguenti protocolli di decellularizzazione dinamica:

Campione #1: P_{max} pari a 1.5 mmHg e P_{min} pari a 0 mmHg;
Campione #2: P_{max} pari a 5 mmHg e P_{min} pari a 0 mmHg.

I valori soglia di P_{max} (freccia in Figura 4.19) rappresentano il valore della pressione intravescicale di poco superiore alla regione di transizione della pressione (puntino verde in Figura 4.19): in questo modo si era certi di distendere in maniera ottimale la vescica esponendo l'intera superficie all'azione degli agenti decellularizzanti mantenendo però un livello non eccessivo di sollecitazione meccanica della ECM dell'organo. Attraverso il SW si è impostato un tempo pari a 1 sec come tempo di attesa per verificare che il valore di P si mantenga al di sopra o al di sotto del valore di P_{max} o P_{min} ed evitare quindi indesiderati passaggi di fase dovuti a spike

del valore di pressione misurato e non al raggiungimento del valore soglia (stabile) desiderato. Le portate di infusione (Q_{INF}) e di aspirazione (Q_{ASP}), per entrambe le prove, sono state impostate rispettivamente pari a 1 ml/min e 2 ml/min. La scelta di impostare la Q_{ASP} pari al doppio della Q_{INF} nasce dal fatto che, fisiologicamente, durante la minzione lo svuotamento della vescica è più rapido del suo riempimento. Inoltre, si è scelto di ridurre la Q_{INF} (1 ml/min) rispetto al valore utilizzato nel protocollo in controllo di volume (5 ml/min) alla luce delle curve di cistometria. Essendo, infatti, il volume necessario per raggiungere il valore di P_{max} pari a circa 4 ml e 8 ml, per i due organi testati, si è deciso di diminuire la Q_{INF} in modo da evitare un riempimento troppo repentino (non fisiologico) dell'organo sempre con l'obiettivo di preservare l'integrità strutturale del tessuto. In tal modo, inoltre, la durata della fase di infusione del nuovo protocollo (pari a 4 min e 8 min per i due organi testati) è comunque paragonabile a quella del protocollo in controllo di volume (4 min).

Dalle curve riportate in Figura 4.19 appare quindi evidente il limite del protocollo precedente: se si fosse infuso il volume teorico di 20 ml, si sarebbero sottoposti entrambi gli organi a livelli di sollecitazione molto superiori a quelli fisiologici, ovvero si sarebbe riempita la vescica fino ad un valore di volume superiore al volume di *overstretching*.

In Figura 4.20 vengono mostrati i tracciati di pressione rispetto al tempo di avanzamento del processo di decellularizzazione per il primo campione trattato.

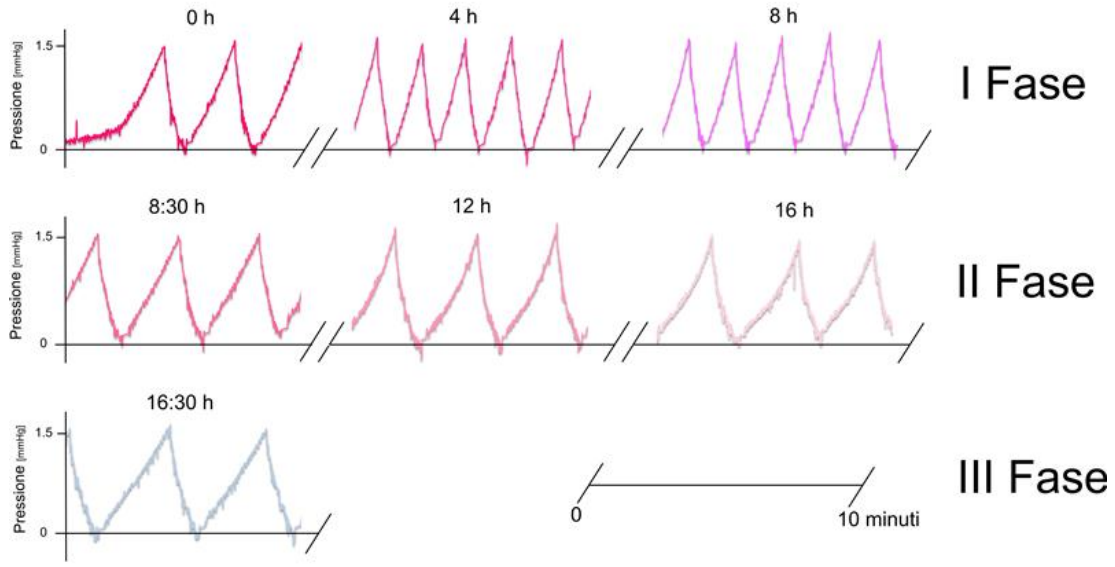


Figura 4.20 Curve della pressione nel tempo durante la decellularizzazione del campione #1. Si può notare come il tracciato rimanga entro i valori soglia impostati ($0 < P < 1.5$ mmHg). I tracciati sono suddivisi in base alla fase del processo di decellularizzazione a cui appartengono.

Le curve mostrano tracciati di pressione della durata di 10 minuti ogni 4 ore di stimolazione. I tracciati di pressione sono suddivisi in base alla fase del processo di decellularizzazione in cui

sono stati acquisiti (8 ore con acqua deionizzata, 8 ore con Triton X-100 e NH_4OH e 1 ora di lavaggio con acqua deionizzata). Per entrambi gli organi processati, si è osservato come per tutte le 17 ore della prova il valore di pressione sia rimasto sempre all'interno del range desiderato ($0 < P_{\#1} < 1.5$ mmHg e $0 < P_{\#2} < 5$ mmHg), ulteriore riprova del corretto funzionamento e della robustezza e della affidabilità garantite del sistema di controllo sviluppato nel presente lavoro di tesi.

Relativamente alla valutazione dell'efficacia del protocollo di decellularizzazione, non sono ad oggi purtroppo ancora disponibili i risultati dell'analisi istologica (Ematossilina e Eosina e Tricromica di Mallory) che il personale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università Statale degli Studi di Milano sta effettuando in questi giorni. Basandosi però sull'osservazione dell'organo pre e post decellularizzazione si può ritenere che per entrambi gli organi si sia giunti ad un'effettiva decellularizzazione dell'organo. In Figura 4.21 viene mostrato il campione di vescica #1 prima (nativo) e dopo la decellularizzazione.

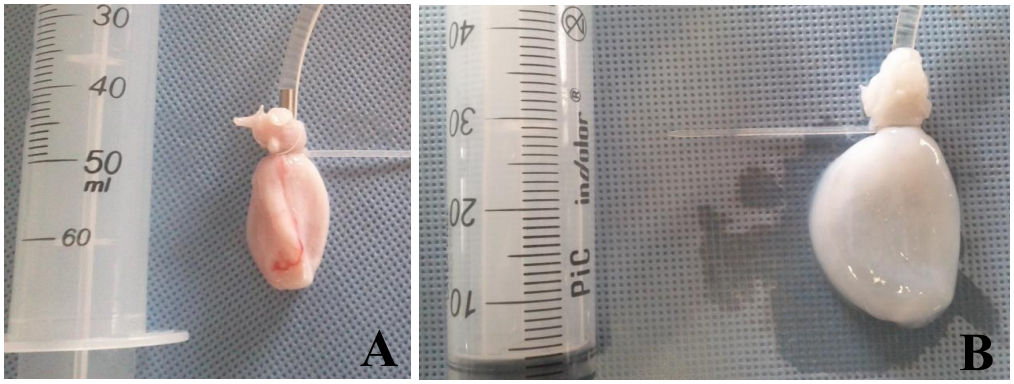


Figura 4.21 Vescica pre (A) e post (B) decellularizzazione.

Dalle fotografie in Figura 4.21 si può osservare infatti come l'organo decellularizzato presenti un colore differente, tendente al bianco, rispetto all'organo nativo (rosa), indice questo dell'effettiva rimozione della componente cellulare.

In Figura 4.22 si riporta il confronto tra le curve P-V degli organi decellularizzati nel presente lavoro di tesi (paragrafo 4.4.2) tramite limitazione in pressione e le curve degli organi decellularizzati tramite il protocollo precedente (controllo in volume) estratte in un precedente lavoro [36].

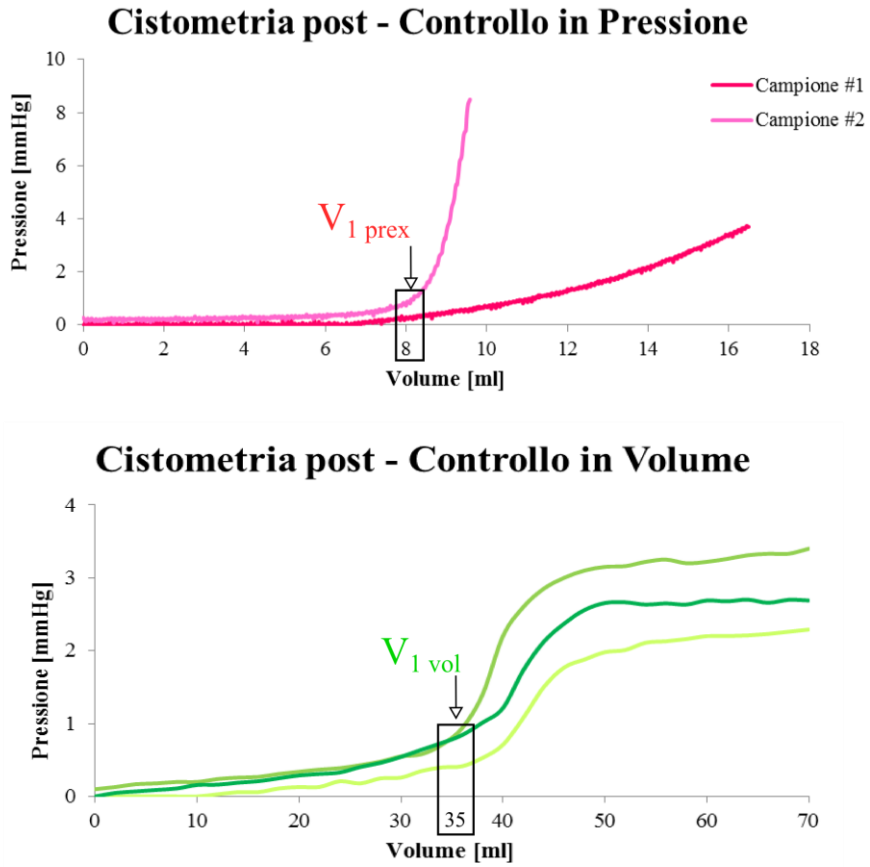


Figura 4.22 Confronto tra curve P(V) di vesciche decellularizzate tramite protocollo modificato e processo gestito dal SW di controllo sviluppato nella Tesi e protocollo precedentemente utilizzato. Sono indicati i valori di V_1 per entrambi i protocolli.

Dall'analisi della curve appare evidente come il V_1 nel protocollo controllato in pressione ($V_{1\ prex}$) sia di circa 4 volte inferiore rispetto il valore di V_1 ottenuto a valle della decellularizzazione effettuata con il protocollo precedentemente utilizzato (infusione ad ogni ciclo di 20ml di soluzione decellularizzante senza monitoraggio del valore della pressione). Il valore più basso del parametro V_1 è indice del fatto che la decellularizzazione tramite limitazione in pressione riesce a ridurre i fenomeni di eccessiva sollecitazione meccanica dell'organo durante il riempimento (paragrafo 4.4.2) e quindi a limitare la variazione del comportamento biomeccanico tra l'organo decellularizzato rispetto all'organo nativo. I campioni #1 e #2, decellularizzati con il protocollo modificato limitato in pressione, non sono stati sollecitati oltre i valori massimi di pressione di 4 e 9 mmHg rispettivamente (Figura 4.22) per mantenere l'integrità dei campioni poiché saranno sottoposti a prove istologiche. Ci si propone in futuro di condurre una campagna con un numero di campioni più esteso per confermare i risultati promettenti ottenuti tramite queste due prove.

Durante entrambe le prove di decellularizzazione è stato utilizzato il SW sviluppato nel presente lavoro di tesi in modalità di limitazione in pressione con un pattern che prevede il ripetersi ciclico (in maniera alternata) delle fasi di infusione-aspirazione-rest. La fase di rest al termine della aspirazione, della durata di 15 sec, è volta a consentire al segnale di pressione di stabilizzarsi al termine della aspirazione in modo da non acquisire valori errati all'inizio della successiva fase di infusione. In Figura 4.23 è mostrato il pannello principale (*Control Pump*) del SW di controllo sviluppato nel presente lavoro di tesi, in cui si possono ritrovare tutti i parametri della prova di decellularizzazione effettuata.

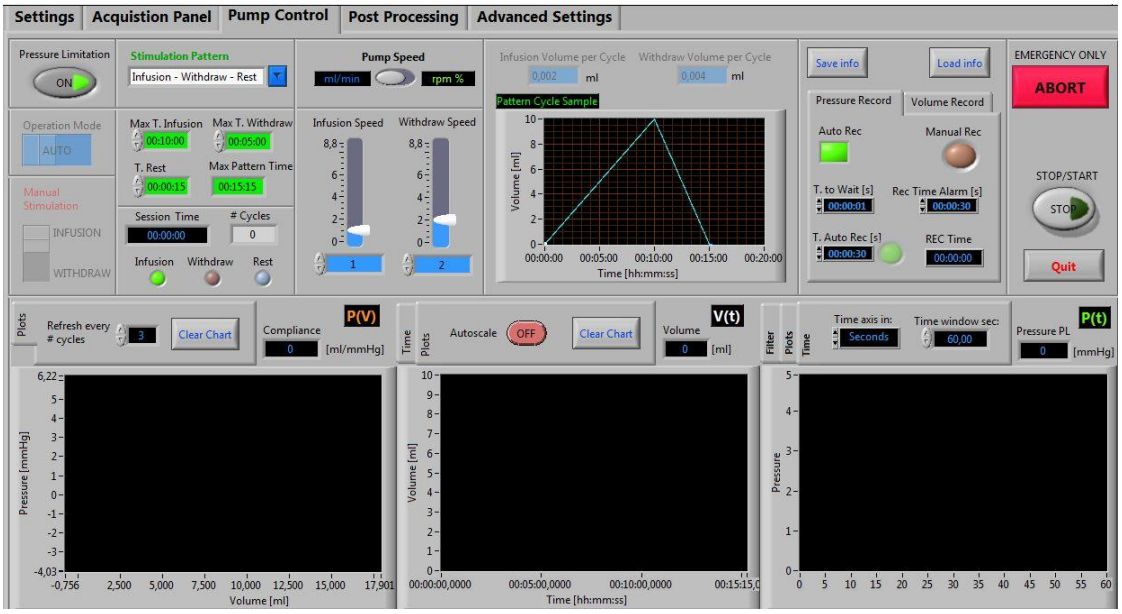


Figura 4.23 Pannello Control Pump del SW sviluppato. Sono impostati i parametri della prova di decellularizzazione. Modalità limitazione in pressione, pattern infusione-aspirazione-rest, tempi massimi per la fase di infusione 10 minuti mentre per la fase di aspirazione 5 minuti, durata fase di rest 15 secondi, portate di 1 e 2 ml/min per la fase di infusione e aspirazione, modalità Auto Rec attiva.

Occorre infine sottolineare come sia per le prove di cistometria che di decellularizzazione dell'organo intero di vescica, è stato usato il set up sperimentale di Figura 4.17 (paragrafo 4.4.1). Nelle prove di cistometria il ramo collegato al reservoir di scarico non deve mai essere attivo e quindi l'EV deve mantenere pervio sempre il ramo di infusione. L'utente abilitando la modalità manuale di controllo in volume può mantenere la stimolazione sempre in infusione, come richiesto in questa prova. Per la prova di decellularizzazione il protocollo della prova è descritto nel paragrafo 4.5.2. Ciò che però è importante sottolineare è come, grazie al sistema di controllo, l'utente può eseguire due differenti prove, di caratterizzazione meccanica e di decellularizzazione, tramite lo stesso set up, semplicemente cambiando la modalità di controllo e i parametri della stimolazione del SW. Non occorre quindi modificare il circuito idraulico tra una

prova e l'altra, riducendo i tempi dovuti alle procedure di riempimento e debollamento del circuito idraulico e quindi il tempo della prova stessa. È possibile quindi caratterizzare l'organo nativo, decellularizzarlo e ricaratterizzarlo senza mai intervenire sul circuito idraulico o sul set up. Tutto ciò si traduce in un vantaggio sostanziale per l'utente sia in termini di tempo che di semplicità nel condurre le prove, permettendo anche a un utente meno esperto di condurre questo tipo di prove.

5.

Conclusioni e sviluppi futuri

Il presente lavoro di tesi, svolto presso il laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale (µBS Lab) del Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria del Politecnico di Milano, ha come obiettivo lo sviluppo di un sistema per il monitoraggio e il controllo di dispositivi in grado di applicare una sollecitazione meccanica a tessuti/organi biologici molli, volta ad esempio, alla caratterizzazione del loro comportamento biomeccanico. In particolare, la stimolazione che viene applicata è di tipo pressorio, applicata tramite un fluido messo in pressione da un attuatore idraulico, che agisce sul tessuto/organo da stimolare/caratterizzare. Il sistema di controllo sviluppato in questo lavoro di tesi si compone di due elementi principali, ovvero la componente hardware (HW), costituita dagli attuatori idraulici, dai sensori utilizzati per il monitoraggio dei parametri della stimolazione e dai cablaggi realizzati per interfacciare l'HW con il computer e dalla componente software (SW), che permette di gestire, ovvero azionare e monitorare, gli elementi dell'HW.

In particolare gli obiettivi che ci si è posti nello sviluppo della parte HW sono:

- minimizzazione degli ingombri del set up messo a punto;
- robustezza ed affidabilità del sistema realizzato.

Dal punto di vista dell'ingombro, a valle del processo di realizzazione del componente HW, è stata ad esempio superata la necessità di impiegare un alimentatore da banco per fornire l'alimentazione ai sensori di pressione. Nel caso del sensore Honeywell 26PCA, infatti, il sensore viene alimentato direttamente tramite un segnale inviato dalla scheda NI DAQ USB-6211; nel caso del sensore Pendotech PRESS-S-000, l'alimentazione viene fornita tramite un alimentatore integrato di dimensioni ridotte (TXL 015-12S, Traco Power). È stato inoltre realizzato un circuito di controllo e di alimentazione dell'elettrovalvola pinza tubo, anch'esso di dimensioni molto contenute.

Dal punto di vista della robustezza e dell'affidabilità dell'HW, in tutti i test di collaudo effettuati per verificare il corretto funzionamento del sistema, così come durante le prove di carattere biologico effettuate, non sono state riscontrate particolari criticità: il sistema infatti ha sempre

garantito il mantenimento della stimolazione impostata dall'utente per tutta la durata della prova, anche per prove di durata elevata fino a 17 ore.

Per quanto riguarda invece lo sviluppo della componente SW le specifiche che il programma deve rispettare sono molteplici.

Il primo requisito che il SW deve garantire è il controllo degli attuatori idraulici impiegati per la stimolazione del tessuto/organo. Questo vuol dire che il SW deve poter tradurre i parametri impostati dall'utente nella definizione del pattern di stimolazione desiderato in termini di segnali (analogici o digitali) che vengono inviati agli attuatori. Al termine della fase di progettazione, realizzazione ed ottimizzazione del sistema di controllo, attraverso gli opportuni cablaggi realizzati per interfacciare gli attuatori con la scheda NI DAQ e quindi con il PC, il SW ha dimostrato la capacità di poter controllare gli elementi dell'HW in diverse condizioni sperimentali di esercizio. Durante la realizzazione del SW, sono stati inoltre risolti alcuni problemi emersi, (come la non corretta gestione da parte della modalità automatica di controllo in volume del segnale di inversione dei rulli della pompa rispetto al parametro di controllo durata della fase di infusione/aspirazione) attraverso l'implementazione di opportune modifiche di specifici blocchi dell'architettura del SW (paragrafo 2.5.3.1.3). Relativamente ad altri problemi riscontrati, quali il ritardo associato all'invio del segnale di cambio fase della pompa, paragrafo 2.5.3.1.2), non si è reso possibile la loro risoluzione in quanto non imputabili al SW sviluppato ma ai limiti fisici della pompa. Riscontrati questi problemi, si è comunque proceduto ad una analisi approfondita degli stessi volta a comprendere l'origine e l'entità di tali criticità, così da poterne tenere conto nelle fasi successive di sviluppo del SW con l'obiettivo di limitare l'effetto indesiderato dei problemi riscontrati. Questa fase di ottimizzazione ha consentito di realizzare un SW di controllo che permette quindi di controllare l'attuazione della pompa volumetrica con un grado di precisione paragonabile a quella fornita del controllore interno alla pompa che gestisce il controllo della pompa tramite i comandi presenti sul display. Relativamente alla gestione del segnale via SW che provoca la commutazione dell'elettrovalvola, si è stati in grado di sincronizzare tale segnale con il comando che gestisce l'inversione del verso di rotazione della pompa.

Seconda specifica che il SW deve rispettare è la possibilità di acquisire un segnale di pressione tramite la scheda NI DAQ, inviato da un sensore di pressione. Il SW ha soddisfatto questa specifica offrendo la possibilità di acquisire fino a sette segnali di pressione differenti su altrettante linee (tra loro connesse o tra loro indipendenti) del circuito idraulico.

Il SW deve poi effettuare un monitoraggio dei parametri di output della stimolazione (pressione e volume, in base alla modalità di controllo scelta dall'utente) così da poter modificare alcuni dei

parametri di input del sistema, in tempo reale durante la stimolazione e mantenere i parametri di stimolazione sempre all'interno del range desiderato. Nel caso in cui l'utente scelga di lavorare in modalità automatica in controllo di volume, il SW è in grado di monitorare uno degli output del sistema, ossia la tensione in uscita dalla pompa che è proporzionale al valore di portata della pompa: in questo modo, in funzione di una eventuale modifica da parte dell'utente dei parametri della stimolazione (valore di portata, durata delle fasi, ecc..) il SW è in grado di aggiornare in tempo reale i segnali da inviare alla pompa per rispettare le nuove richieste da parte dell'utente, ad esempio in termini di volume da infondere/aspirare ad ogni ciclo. Anche la modalità automatica di limitazione in pressione soddisfa questo requisito poiché in base al valore di pressione acquisito dal sensore, il SW è in grado di agire, modificandoli durante l'esecuzione della stimolazione, sui parametri che definiscono il pattern di stimolazione (passaggio dalla fase di infusione a quella di aspirazione, durata delle fasi, ecc..) così da mantenere la pressione che agisce sul tessuto/organo stimolato all'interno del range definito dalle soglie impostate dall'utente.

Al fine di poter monitorare costantemente i parametri della stimolazione, il SW fornisce all'utente la possibilità di visualizzarli in modo immediato e intuitivo. Tramite le tre finestre grafiche del pannello di controllo (*Control Pump*, paragrafo 2.5.3.2) dell'interfaccia utente, l'utente può visualizzare il segnale di pressione e di volume rispetto al tempo della stimolazione. Inoltre il SW integra questi due segnali così che l'utente possa visualizzare, nella finestra grafica dedicata, la variazione della pressione che agisce sul tessuto/organo in funzione del volume processato dalla pompa, in tempo reale.

Con l'obiettivo di garantire un controllo sullo stato della stimolazione che prevenga situazioni indesiderate, sono stati integrati nel SW diversi controlli di sicurezza, ad esempio la soglia massima sul valore di pressione. Nel caso in cui il SW rilevi il superamento del valore soglia determinato dall'utente, provoca l'immediato arresto della pompa e quindi della stimolazione per evitare di danneggiare il campione biologico, ed abilita l'invio di un messaggio di *alert* sulla finestra di interfaccia utente.

Ulteriore specifica del SW sviluppato è la possibilità di registrare i parametri della stimolazione (pressione e volume) così che l'utente possa elaborarli in un secondo momento, al termine della stimolazione. Il SW mette a disposizione due modalità di registrazione: i) la modalità manuale, in cui i dati vengono registrati in funzione dei comandi abilitati dall'utente tramite interfaccia grafica, e ii) la modalità automatica, in cui l'utente imposta l'intervallo di tempo per cui vuole registrare i dati di interesse che vengono poi registrati ciclicamente, in maniera automatica, dal SW e salvati su un file di teso. Nel file di testo, ciascun blocco di dati registrato è preceduto da

un'intestazione che riportata tutte le informazioni che consentono all'utente di risalire alla specifica fase della stimolazione a cui i dati registrati fanno riferimento.
Il SW mette a disposizione dell'utente anche alcune funzioni di post processing automatiche (filtraggio tramite media mobile, calcolo del valore medio e relativa deviazione standard) dei dati, attraverso i comandi posti in un apposito pannello dell'interfaccia utente.
Poiché questo SW è dedicato all'utilizzo da parte di utenti esperti e meno esperti, esso deve soddisfare la specifica di semplicità di utilizzo ed intuitività dei comandi da azionare. Si è quindi sviluppata un'interfaccia utente in grado di "guidare" l'utente nell'impostazione di tutti i parametri della stimolazione, escludendo quindi la possibilità che l'utente possa settare i diversi parametri in maniera non coerente tra loro.
Dal punto di vista della sua architettura, nell'ottica di futuri ulteriori sviluppi del sistema di controllo, che potrebbero emergere sulla base di nuove applicazioni di utilizzo del SW, il SW garantisce la possibilità di integrare nuove funzionalità o modificare quelle preesistenti in funzione delle nuove richieste da parte dell'utilizzatore. Tramite l'integrazione nel software di specifici SubVI (paragrafo 3.1.2) si è reso infatti possibile l'aggiornamento di singole parti del SW senza doverne modificare l'architettura generale.
Ultima specifica, non certo per importanza, che il SW deve garantire è l'affidabilità e la robustezza del sistema realizzato. Come descritto nel Capitolo 3, è stato necessario apportare alcune modifiche dell'architettura e della logica di funzionamento del SW in corso d'opera, per garantire la corretta esecuzione delle funzionalità messe a disposizione dal sistema di controllo per tutta la durata della stimolazione ed in diverse condizioni di lavoro. A valle di queste modifiche, le prove di collaudo hanno dimostrato come il SW, in tutte e tre le modalità di controllo disponibili, esegua correttamente le operazioni richieste e sia in grado di fornire la stimolazione desiderata per tutta la durata della prova.

Il sistema di controllo realizzato è stato poi utilizzato integrandolo in tre diversi set up sperimentali (prove di compliance, permeabilità, cistometria) volti principalmente alla caratterizzazione del comportamento biomeccanico di organi/tessuti e in un set up utilizzato per la decellularizzazione dinamica di un organo intero (decellularizzazione della vescica). Si è voluto quindi dimostrare come il sistema di controllo sviluppato sia dotato di estrema versatilità.
Nelle quattro condizioni di prova, in cui il SW è stato impiegato, i risultati ottenuti sono stati incoraggianti. In particolare, nel caso della prova per la caratterizzazione della compliance della vena safena, così come nel trattamento di decellularizzazione della vescica, la modalità in limitazione di pressione ha permesso di migliorare i protocolli preesistenti, superando alcuni dei

limiti che essi presentavano. In ottica futura quindi, il sistema di controllo sviluppato potrà essere impiegato in un range ancora più ampio di applicazioni. Infatti, i quattro set up sperimentali in cui è stato utilizzato il SW nell'ambito del presente lavoro sono solo alcuni esempi applicativi: il SW è infatti applicabile in tutte quelle condizioni sperimentali che prevedono la stimolazione di un tessuto tramite l'infusione di fluido in pressione, quali ad esempio la fase di stimolazione di un tessuto ricellularizzato volta alla sua funzionalizzazione pre impianto *in vivo*.

Il sistema realizzato dimostra di soddisfare tutte le specifiche che ci si era posti all'inizio del presente lavoro di tesi, sia per quanto riguarda la componente HW che SW. Nonostante ciò il sistema di controllo presente ancora dei limiti e sono stati quindi identificati alcuni possibili sviluppi futuri.
Per quanto riguarda l'HW l'impiego di una pompa volumetrica OEM miniaturizzata potrebbe ulteriormente ridurre l'ingombro del sistema. Alla luce della ricerca di mercato condotta è stata individuata la pompa P625/10K.143 prodotta da Instech, come possibile soluzione.

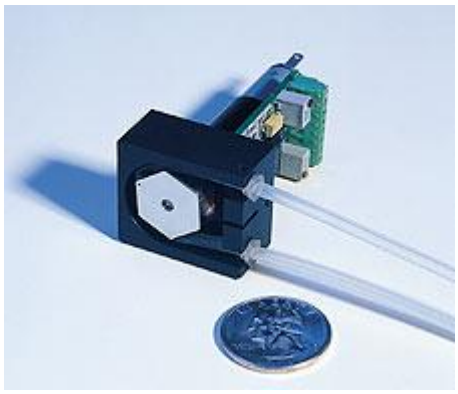


Figura 5.1 Pompa volumetrica P625/10K.143 prodotta da Instech.

Questa pompa oltre ad avere ingombri molto ridotti, eroga portate molto basse (μl/min), adeguate pertanto ad esempio ad un futuro impiego del sistema di controllo nel processo di ricellularizzazione di matrici decellularizzate.
Inoltre l'impiego di più teste pompanti consentirebbe di realizzare set up sperimentali in cui i circuiti idraulici sono tra loro completamente indipendenti, così da poter effettuare nell'ambito della medesima campagna sperimentale più prove in parallelo, impostando, per ciascun campione biologico, uno specifico pattern di stimolazione e mantenendo comunque il controllo sui parametri della stimolazione di ciascun campione.
Dal punto di vista del SW, si potrebbe inoltre modificare il sistema di controllo sviluppato integrando tra loro le modalità in limitazione in pressione e in volume. Si potrebbe così

impostare una stimolazione in cui, ad esempio, la fase di infusione è gestita tramite limitazione in pressione: ad esempio, tale modalità consentirebbe di effettuare il protocollo dinamico di decellularizzazione della vescica effettuando il riempimento dell'organo fino al raggiungimento della pressione soglia e forzando poi lo svuotamento completo, quindi fino a totale rimozione del volume precedentemente infuso. Inoltre si potrebbe ampliare la gamma di pattern di stimolazione permettendo all'utente di decidere il numero delle fasi (allo stato attuale massimo tre) e l'ordine delle stesse: ad esempio si potrebbe prevedere di costruire pattern di stimolazione in cui ci sia una fase di rest sia a valle dell'infusione che a valle dell'aspirazione. Infine, si potrebbe pensare di modificare il SW in modo da implementare dei cicli di stimolazione in cui i parametri della stimolazione (soglia di pressione, portata, durata delle fasi, sequenza delle fasi, ecc..) siano modificabili ad intervalli di tempo definiti dall'utente, in funzione della differente risposta del tessuto, nel breve o nel lungo termine, alla stimolazione imposta. Ciò permetterebbe di impiegare il sistema di controllo anche con camere di coltura per la rigenerazione di tessuti tramite la ricellularizzazione di matrici biologiche e non.

APPENDICE A

Dimensionamento del circuito di amplificazione dei sensori di pressione

Nel presente lavoro di tesi sono stati impiegati due diversi sensori di pressione: il sensore Honeywell 26PCA (HW) e il sensore Pendotech Press-S-000 (PT), i quali differiscono, principalmente per il diverso Fondo Scala (FS) ovvero il valore massimo di pressione che il sensore è in grado di acquisire. Il valore di FS, descritto nel datasheet dei due sensori [21, 22],è pari rispettivamente a 51.7 mmHg (HW) e 250 mmHg (PT). Al valore di FS i due sensori emettono un valore di tensione molto basso, pari rispettivamente a 16.7 mV (HW) e 14.75 mV (PT).

Come accennato nel Capitolo 2 (paragrafo 2.2.2), il circuito di amplificazione è stato realizzato al fine di amplificare il valore di tensione in uscita dai sensori così da poter sfruttare tutto il Full Scale Range (FSR = 0-10 V nel caso di pressioni sempre positive) della scheda di acquisizione e quindi massimizzare la risoluzione del sistema di acquisizione (Sensore + scheda NI DAQ) della pressione tramite il software.

Il circuito, analogo per i due sensori HW e PT è mostrato in figura A1:

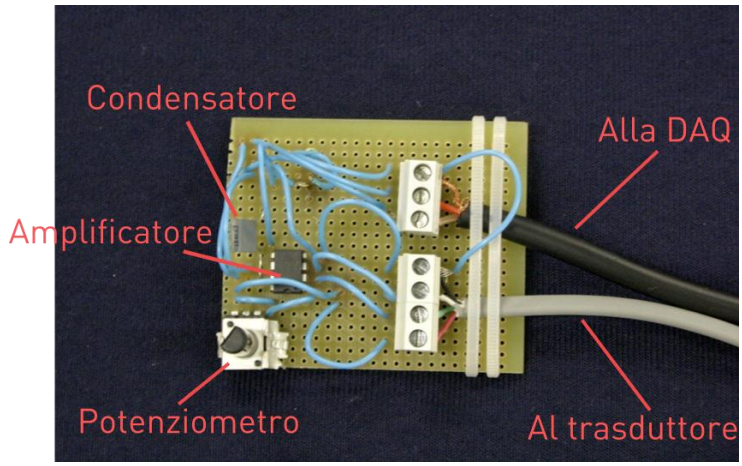


Figura A1 Circuito di amplificazione sensore di pressione: in figura viene mostrato il circuito per il sensore *HW*

Il circuito è composto da:

- Amplificatore operazionale (AD627, Analog Devices Inc.)
- Condensatore da 0.1 μF (104K63, Kemet): dimensionato per evitare sovraccarichi di tensione che potrebbero danneggiare l'amplificatore
- Potenziometro (PTV09A, Bourns): permette di settare il valore della resistenza di guadagno (R_G)
- Cablaggio per ricevere il segnale del sensore ed inviare i dati acquisiti alla DAQ
- Cablaggio per l'alimentazione del sensore

Tra questi, l'elemento che determina l'effettiva amplificazione della tensione emessa dal sensore è l'amplificatore operazionale (AD627), il cui schema della piedinatura è riportato in Figura A2 [40]:

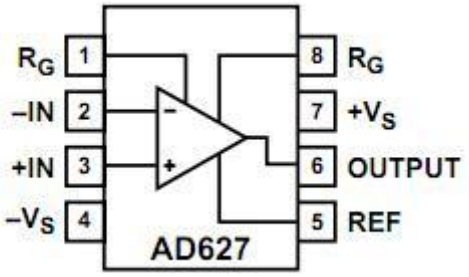


Figura A2 Schema della piedinatura dell'AD627AN. Pin 1 e 8: collegamento della resistenza di guadagno (potenziometro); Pin 2 e 3: ingresso del segnale acquisito dal sensore ; Pin 4 e 7 alimentazione dell'amplificatore; Pin 5 e 6: uscita del segnale amplificato da inviare alla DAQ

Come descritto nel datasheet dell'amplificatore [40], il guadagno (G_{AMP}) dell'integrato determina il valore di amplificazione del segnale che esso riceve in ingresso (dal sensore), secondo la relazione riportata nell'equazione 1:

$$V_{out} = G_{AMP}\, x\, V_{in} \tag{4}$$

Dall'equazione 1 si ricava quindi che il valore di G_{AMP} per i due sensori è pari a (Eq. 2):

$$G_{AMP-HW} = \frac{10\ V}{16.7\ mV} = 598$$
$$G_{AMP-PT} = \frac{10\ V}{16.7\ mV} = 678 \tag{5}$$

L'equazione 3 [40], consente quindi di determinare il valore di R_G, da settare attraverso il potenziometro, per ottenere il guadagno desiderato per i due sensori:

$$R_G = 200\ k\Omega\ x\ (G_{AMP} - 5) \tag{6}$$

Dall'Eq. 3 si ricava dunque che $R_{G\text{-}HW}$ = 337 Ω e $R_{G\text{-}PT}$ = 297 Ω.

In figura A3 viene schematizzata la relazione tra la pressione acquisita dal sensore e il valore di tensione, ad essa associata, erogato tramite il circuito di amplificazione.

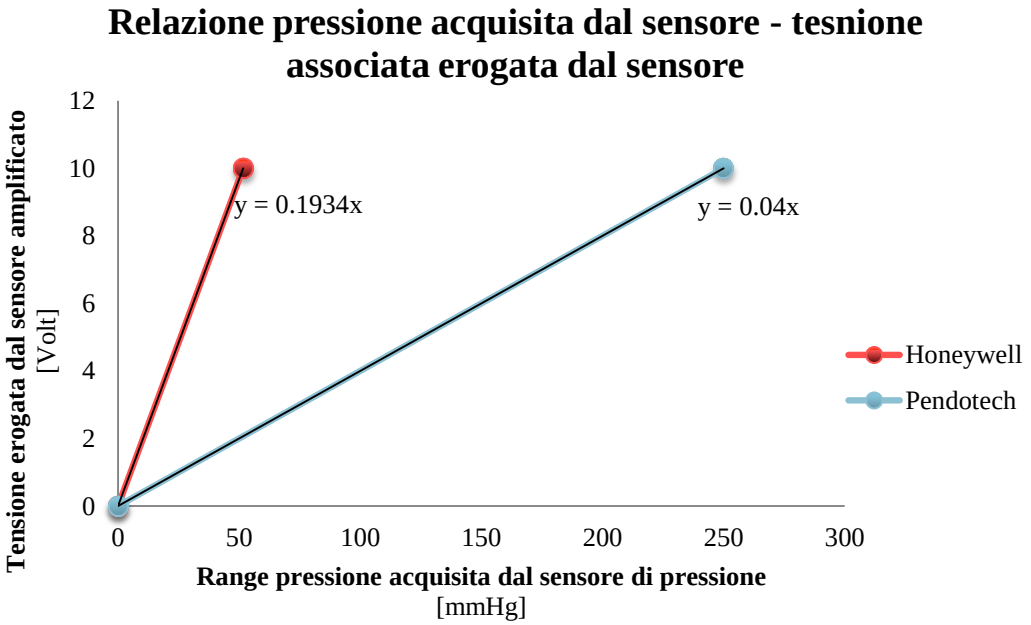


Figura 0.13 Relazione tra il segnale di pressione [mmHg] acquisito dal sensore ed il valore, ad esso associato, della tensione [V] erogata dal sensore tramite il circuito di amplificazione

Il coefficiente angolare della retta del grafico in figura A3 rappresenta la risoluzione (ρ) del sensore di pressione amplificato (Eq. 4)

$$\rho_{HW} = \frac{10\ V}{51.7\ mmHg} = 0.193 \frac{V}{mmHg} \tag{7}$$

$$\rho_{PT} = \frac{10\ V}{250\ mmHg} = 0.04 \frac{V}{mmHg}$$

Procedendo poi al calcolo della risoluzione della scheda NI DAQ (ρ_{DAQ}, Eq. 5), pari al rapporto tra il FSR della scheda NI DAQ (+10 V) e il numero dei livelli di discretizzazione del segnale acquisito dalla scheda NI DAQ, funzione del numero di bit della scheda (16 nel caso del modello USB-6211) indicato come Digital Value = 2^{16} livelli

$$\rho_{DAQ} = \frac{FSR}{Digital\ Value} = \frac{10\ V}{2^{16}} = 0.153\ mV \tag{8}$$

si giunge a determinare il valore minimo di pressione (ΔP_{AMP_min}) rilevabile dal sensore di pressione amplificato (Eq. 6):

$$\Delta P_{AMP_\min HW} = \frac{\rho_{DAQ}}{\rho_{HW}} = \frac{0.153}{0.193}\frac{mV}{\frac{V}{mmHg}} = 0.8 \cdot 10^{-3}\ mmHg$$
$$\Delta P_{AMP_\min PT} = \frac{\rho_{DAQ}}{\rho_{PT}} = \frac{0.153}{0.04}\frac{mV}{\frac{V}{mmHg}} = 3.8 \cdot 10^{-3}\ mmHg \tag{9}$$

Se non si fosse realizzato il sistema di amplificazione, la scheda NI DAQ avrebbe ricevuto dal sensore di pressione una tensione massima di 16.7 mV (HW) e 14.75 mV (PT). Inserendo questi valori nella Eq. 4 ed utilizzando i valori ottenuti per il calcolo delle Eq. 5 e 6, si ottiene un ΔP_{NoAMP_min} rilevabile pari a 0.474 mmHg per il sensore HW e 2.593 mmHg per il sensore PT.
In definitiva, il dimensionamento del circuito di amplificazione ha consentito di aumentare la sensibilità (σ) del sistema di acquisizione della pressione di un fattore (η) pari a (Eq. 7):

$$\eta_{HW} = \frac{\Delta P_{NoAMP_\min HW}}{\Delta P_{AMP_\min HW}} = \frac{0.474\ mmHg}{0.8 \cdot 10^{-3}\ mmHg} = 592.5$$
$$\eta_{PT} = \frac{\Delta P_{NoAMP_\min PT}}{\Delta P_{AMP_\min PT}} = \frac{2.593\ mmHg}{3.8 \cdot 10^{-3}\ mmHg} = 682.4 \tag{10}$$

Bibliografia

1. Chaudhuri, J. and M. Al-Rubeai, *Bioreactors for Tissue Engineering: Principles, Design and Operation*. Vol. VIII, . 2005: Springer. 375.
2. Plunkett, N. and F.J. O'Brien, *Bioreactors in tissue engineering.* Technol Health Care, 2011. **19**(1): p. 55-69.
3. Martin, I., D. Wendt, and M. Heberer, *The role of bioreactors in tissue engineering.* Trends Biotechnol, 2004. **22**(2): p. 80-6.
4. Wendt, D., et al., *Potential and bottlenecks of bioreactors in 3D cell culture and tissue manufacturing.* Adv Mater, 2009. **21**(32-33): p. 3352-67.
5. Bono, N. and L. Casadonte, *Sviluppo di un sistema di coltura di segmenti di vena safena per lo studio ex vivo del vein graft disease*, in *Tesi di Laurea Magistrale, Dipartimento di Bioingnegeria*. 2012, Politecnico di Milano. p. 187.
6. Atala, A., *Engineering organs.* Curr Opin Biotechnol, 2009. **20**(5): p. 575-92.
7. Consolo, F., et al., *Multilevel Experimental and Modelling Techniques for Bioartificial Scaffolds and Matrices*, in *Scanning Probe Microscopy in Nanoscience and Nanotechnology*, B. Bhushan, Editor. 2010, Springer Berlin Heidelberg. p. 425-486.
8. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering.* Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
9. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes.* Biomaterials, 2011. **32**(12): p. 3233-43.
10. Sullivan, D.C., et al., *Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system.* Biomaterials, 2012. **33**(31): p. 7756-64.
11. Mantero, S., et al., *Fondamenti di Ingengeria dei Tessuti per la Medicina Rigenerativa*, ed. I. Biomedica. Vol. 15. 2009: Patron. 216.
12. Darling, E.M. and K.A. Athanasiou, *Articular cartilage bioreactors and bioprocesses.* Tissue Eng, 2003. **9**(1): p. 9-26.
13. Mauck, R.L., et al., *Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSCs in 3D culture in response to dynamic loading.* Biomech Model Mechanobiol, 2007. **6**(1-2): p. 113-25.
14. Altman, G.H., et al., *Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering.* J Biomech Eng, 2002. **124**(6): p. 742-9.

15. Diamantouros, S., *A Pulsatile Bioreactor System for Durability Testing and Compliance Estimation of Vascular Graft*, in *PhD Thesis*. 2011, Helmholtz Institute for Biomedical Engineering: Aachen, Germany.
16. Shkilnyy, A., et al., *Bioreactor controlled by PI algorithm and operated with a perfusion chamber to support endothelial cell survival and proliferation.* Biotechnol Bioeng, 2012. **109**(5): p. 1305-13.
17. Wallis, M.C., et al., *Feasibility study of a novel urinary bladder bioreactor.* Tissue Eng Part A, 2008. **14**(3): p. 339-48.
18. Schipke, K.J., S.D. To, and J.N. Warnock, *Design of a cyclic pressure bioreactor for the ex vivo study of aortic heart valves.* J Vis Exp, 2011(54).
19. Ismatec-Idex, *Ismatec IPC / IPC-N Operating Manual*. p. 48.
20. National-Instrument, *NI USB-621x User Manual*. 2009, National Instrument. p. 204.
21. PendoTECH, *PendoTECH Single Use Pressure Sensors Specification Sheet.* 2011: p. 2.
22. Honeywell, *Installation Instructions for the 26PC Series Pressure Sensors*. 2002. p. 4.
23. Cassani, D. and F. Ballo, *Ottimizzazione di un sistema di acquisizione di dati relativi a test di compliance su tessuti biologici*, in *Tesi di Laurea di I livello, Dipartimento di Bioingnegeria*. 2011, Politecnico di Milano.
24. Melchiorre, A., *Allestimento della strumentazione per la misura delle pressione in un banco prova emodinamico pulsatile in-vitro*, in *Tesi di Laurea di I livello, Dipartimento di Bioingnegeria*. 2012, Politecnico di Milano.
25. Bio-Chem-Fluidics, *Solenoid Operated Pinch Valves*. 2011. p. 20.
26. National-Instrument, *LabVIEW Tutorial Manual*. 1996, National Instruments Corporation. p. 250.
27. Piola, M., *Sviluppo e test preliminare di un bioreattore a perfusione destinato all'espansione di cellule staminali ematopoietiche*, in *Tesi di laurea in Ingegneria biomedica* 2009, Politecnico di Milano. p. 121.
28. Dummler, S., et al., Pulsatile ex vivo perfusion of human saphenous vein grafts under controlled pressure conditions increases MMP-2 expression. Biomed Eng Online, 2011. **10**: p. 62.
29. Motwani, J.G. and E.J. Topol, *Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention.* Circulation, 1998. **97**(9): p. 916-31.
30. Redaelli, A. and F. Montevecchi, *Biomeccanica - anslisi multiscala di tessui biologici*. 2007, Bologna: Patron Editore.

31. Cambiaghi, A. and M. De Santo, *Sviluppo di un sistema di misura della compliance di tratti di vasi sanguigni di piccolo calibro,* in *Tesi di Laurea di primo livello, Dipartimento di Bioingnegeria* 2011, Politecnico di Milano. p. 73.
32. Atala, A., et al., *Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty.* Lancet, 2006. **367**(9518): p. 1241-6.
33. Cartwright, L.M., et al., *Porcine bladder acellular matrix porosity: impact of hyaluronic acid and lyophilization.* J Biomed Mater Res A, 2006. **77**(1): p. 180-4.
34. Farhat, W., et al., *Porosity of porcine bladder acellular matrix: impact of ACM thickness.* J Biomed Mater Res A, 2003. **67**(3): p. 970-4.
35. Urban, A., *Ingegneria del tessuto urovescicale: caratterizzazione della matrice decellularizzata e sviluppo di un sistema di coltura per la sua sollecitazione meccanica in fase di ricellularizzazione in vitro,* in *Tesi di Laurea Magistrale, Dipartimento di Bioingnegeria* 2012, Politecnico di Milano. p. 187.
36. Consolo, F., et al., *Dynamic perfusion for intact-bladder decellularization: analysis of the acellular matrix distention properties.* Histology and Histopathology - Cellular and Molecular Biology, 2011. **26**(S1).
37. Masson, I., et al., *Mechanical properties of arteries cryopreserved at -80 degrees C and -150 degrees C.* Med Eng Phys, 2009. **31**(7): p. 825-32.
38. Bolland, F., et al., *Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering.* Biomaterials, 2007. **28**(6): p. 1061-70.
39. Yang, B., et al., *Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering.* Tissue Eng Part C Methods, 2010. **16**(5): p. 1201-11.
40. Analog-Devices, *AD627 datasheet*. 2005. p. 24.